



**You have downloaded a document from
RE-BUS
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Ultrastruktura ściany komórek epidermy łuski cebuli *Allium cepa* oraz jej odkształcenia towarzyszące plazmolizie i deplazmolizie

Author: Sandra Natonik-Białoń

Citation style: Natonik-Białoń Sandra. (2020). Ultrastruktura ściany komórek epidermy łuski cebuli *Allium cepa* oraz jej odkształcenia towarzyszące plazmolizie i deplazmolizie. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersytet ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

SANDRA NATONIK-BIAŁOŃ

Rozprawa doktorska

**„Ultrastruktura ściany komórek epidermy łuski cebuli *Allium cepa* oraz jej
odkształcenia towarzyszące plazmolizie i deplazmolizie.”**

Promotor:

PROF. DR HAB. DOROTA KWIATKOWSKA

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Promotor pomocniczy:

DR DOROTA BOROWSKA-WYKRĘT

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Praca została wykonana w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki
(MAESTRO nr 2011/02/A/NZ3/00079).

Katowice 2020

Serdeczne podziękowania składam
Pani Prof. dr hab. Dorocie Kwiatkowskiej
za poświęcony czas, cenne dyskusje
i wskazówki oraz nieocenioną pomoc
w przygotowaniu niniejszej rozprawy.

Serdeczne podziękowania składam także
Pani Dr. Dorocie Borowskiej-Wykręt
za wszystkie sugestie oraz wsparcie
podczas przygotowywania niniejszej rozprawy.

Dziękuję również rodzinie oraz pracownikom
Katedry Biofizyki i Morfogenezy Roślin
za wszelką okazaną życzliwość i pomoc.

SPIS TREŚCI

I. Wstęp.....	4
I.1. Struktura i właściwości mechaniczne ściany komórkowej.....	4
I.1.1. Regulacja kierunku odkładania mikrofibryl celulozowych w ścianie komórkowej.....	4
I.1.2. Zależność właściwości mechanicznych ściany od układu mikrofibryl celulozowych.....	7
I.1.3. Układ mikrofibryl celulozowych oraz właściwości mechaniczne ścian komórek adaksjalnej epidermy łuski cebuli.....	8
I.2. Naprężenia ściany komórkowej.....	9
I.2.1. Naprężenie wynikające bezpośrednio z turgoru.....	9
I.2.2. Naprężenia tkankowe.....	10
I.3. Odształcenia ściany żywych komórek.....	13
I.3.1. Wzrost komórek roślinnych – plastyczne odształcenie ściany komórkowej....	14
I.3.2. Odształcenie elastyczne ściany a wzrost komórki.....	15
I.3.3. Zależność wzrostu od układu fibryl celulozowych w ścianie.....	17
I.3.4. Ciśnienie turgorowe, właściwości mechaniczne ściany a kształt i rozmiary komórki.....	20
I.3.5. Wyboczenie warstw ściany komórkowej na skutek zniesienia naprężeń.....	23
I.4. Plazmoliza oraz deplazmoliza jako skutki traktowania osmotycznego.....	26
I.4.1. Połączenia błony komórkowej ze ścianą w komórkach plazmolizowanych.....	28
I.4.2. Reorganizacja błony komórkowej.....	29
I.4.3. Zaburzenie łączności symplazmowej.....	29
I.4.4. Organizacja elementów cytoszkieletu podczas plazmolizy.....	30
II. Cel pracy.....	31
III. Materiał i metody.....	32
III.1. Materiał roślinny.....	32
III.2. Metody badania układów fibryl celulozowych w ścianie komórkowej oraz prążków na wewnętrznej powierzchni ściany.....	33
III.2.1. Badania układu fibryl celulozowych na wewnętrznej powierzchni ściany peryklinalnej przy użyciu mikroskopu sił atomowych.....	33
III.2.2. Układ fibryl celulozowych w ścianie peryklinalnej mierzony przy użyciu mikroskopu polaryzacyjnego.....	36

III.2.3. Układ prążków na wewnętrznej powierzchni ściany widocznych w mikroskopii Nomarskiego.....	38
III.3. Metody analizy odkształceń komórek epidermy cebuli towarzyszących plazmolizie oraz deplazmolizie.....	39
III.3.1. Obserwacje przyżyciowe epidermy w mikroskopie konfokalnym.....	39
III.3.2. Obliczanie odkształcenia objętościowego komórek towarzyszącego plazmolizie oraz deplazmolizie.....	40
III.3.3. Obliczanie odkształcenia powierzchniowego zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek epidermy towarzyszącego plazmolizie oraz deplazmolizie.....	42
III.4. Wykorzystywane parametry opisujące kształt i rozmiar komórek.....	42
III.5. Narzędzia komputerowe wykorzystywane do opracowania wyników.....	44
IV. Wyniki.....	45
IV.1. Względne odkształcenie objętościowe komórek epidermy towarzyszące plazmolizie oraz deplazmolizie.....	45
IV.1.1. Względne odkształcenie objętościowe komórek epidermy o jądrach niezabarwionych PI.....	45
IV.1.2. Komórki epidermy o jądrach zabarwionych PI.....	53
IV.2. Odkształcenie powierzchniowe epidermy towarzyszące plazmolizie oraz deplazmolizie.....	56
IV.2.1. Względne odkształcenie powierzchniowe zewnętrznej ściany peryklinalnej...56	
IV.2.2. Główne kierunki odkształcenia powierzchni epidermy.....	58
IV.2.3. Zmiany krzywizny zewnętrznej ściany peryklinalnej.....	60
IV.3. Układ prążków na wewnętrznej powierzchni zewnętrznej ściany peryklinalnej epidermy.....	61
IV.4. Układ fibryl celulozowych na wewnętrznej powierzchni zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek epidermy.....	65
IV.5. Układ fibryl celulozowych na całej grubości zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek epidermy.....	72
V. Dyskusja.....	76
V.1. Jodek propidyny jako znacznik jąder martwych komórek.....	76
V.2. Zmiany ciśnienia osmotycznego a wnikanie PI do komórek epidermy łusek cebuli...78	
V.3. Odkształcenie objętościowe komórek epidermy cebuli wywołane traktowaniem osmotycznym.....	79

V.4. Odształcenie powierzchniowe zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek epidermy cebuli wywołane traktowaniem osmotycznym.....	82
V.5. Artefakty w badaniach układu fibryl celulozowych na wewnętrznej powierzchni ściany przy użyciu AFM.....	86
V.6. Orientacja fibryl celulozowych w ścianie komórek epidermy łusek cebuli na różnych etapach rozwojowych.....	88
VI. Wnioski.....	90
VII. Literatura.....	92
VIII. Streszczenie/Summary.....	101
VIII.1. Streszczenie.....	101
VIII.2. Summary.....	103
Aneks.....	107
An.1. Metoda odsłaniania wewnętrznej powierzchni zewnętrznych ścian peryklinalnych komórek epidermy.....	107
An.2. Obliczanie kąta nachylenia fibryl celulozowych względem długiej osi komórki na podstawie pomiarów za pomocą narzędzia ImageJ FibrilTool.....	109
An.3. Lista publikacji z udziałem Doktoranta.....	111
An.4. Natonik-Białoń S., Borowska-Wykręt D., Mosca G., Grelowski M., Wrzałik R., Smith R., Kwiatkowska D. 2020. <i>Deformation of a cell monolayer due to osmotic treatment: a case study of onion scale epidermis</i> . Botany 98:21–36.....	112

I. Wstęp.

I.1. Struktura i właściwości mechaniczne ściany komórkowej.

Protoplasty komórek roślinnych otoczone są ścianą komórkową. W rosnących komórkach występuje pierwotna ściana komórkowa, która jest cienka, elastyczna i mocno uwodniona. Przylegające do siebie ściany pierwotne dwóch sąsiadujących komórek sklejone są blaszką środkową, która składa się głównie z pektyn. W komórkach, które zakończyły wzrost, na powierzchni ściany pierwotnej odkładana jest często wtórna ściana komórkowa, która jest grubsza, sztywniejsza i mniej uwodniona od ściany pierwotnej, dzięki czemu zapewnia tkankom sztywność i wytrzymałość (Cosgrove, Jarvis 2012; Hejnowicz 2012).

Jednym z podstawowych składników ściany komórek roślinnych jest celuloza. Łańcuchy celulozy tworzą mikrofibryle celulozowe (MF), które często łączą się w pęczki nazywane fibrylami celulozowymi (Hejnowicz 2012). MF osadzone są w macierzy (matriks) składającej się z hemiceluloz, pektyn i białek. Zawartość poszczególnych składników w ścianach pierwotnych i wtórnych jest różna (Cosgrove, Jarvis 2012; Hejnowicz 2012). MF są najszywniejszym składnikiem ściany komórkowej (Ha i in. 1997; Love i in. 1998). Dlatego stanowią one rusztowanie ściany, a ich układ przekłada się na jej właściwości mechaniczne (Paradez i in. 2006).

I.1.1. Regulacja kierunku odkładania mikrofibril celulozowych w ścianie komórkowej.

MF odkładane są w ścianie komórkowej przez kompleksy syntazy celulozowej, która jest enzymem zlokalizowanym w błonie komórkowej. Przyjmuje się, że MF odkładane są w ścianie równoległe do układu mikrotubul (MT) kortykalnych (Baskin 2001; Paradez i in. 2006). Istnieją dwie koncepcje wyjaśniające tę zależność. Pierwsza z nich zakłada, że MT pełnią rolę torów, po których przesuwały się kompleksy syntazy celulozowej, odkładając w ścianie MF równoległe do MT (Heath 1974). Według drugiej koncepcji sąsiednie MT wyznaczają granice kanałów, którymi porusza się syntaza celulozowa, co również skutkuje odkładaniem MF równoległe do MT (Giddings, Staehelin 1991 wg Paradez i in. 2006). Badania przeprowadzone na komórkach epidermy hipokotyła linii transgenicznej *Arabidopsis thaliana*, z białkiem fluorescencyjnym YFP (*Citrine Yellow Fluorescent Protein*) przyłączonym do syntazy celulozowej oraz białkiem fluorescencyjnym CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) przyłączonym do α -tubuliny, pozwoliły na równoczesną, przyżyciową obserwację w mikroskopie konfokalnym przemieszczania się syntazy celulozowej w błonie komórkowej oraz układu MT. Wykazały one, że syntaza celulozowa faktycznie porusza się po torach ściśle wyznaczonych przez MT, co skutkuje odkładaniem w ścianie MF

równoległych do MT korykalnych. Krótkotrwałe traktowanie komórek oryzaliną, prowadzące do zaburzenia w układzie MT, powodowało zmiany w kierunku poruszania się syntazy celulozowej zgodne ze zmienionym układem MT, czyli syntaza w dalszym ciągu poruszała się i odkładała nowe MF w kierunku równoległym do układu MT (Paradez i in. 2006).

Ruchy syntazy celulozowej po torach wyznaczonych przez MT są możliwe dzięki białku POM2/CSII, które jest łącznikiem pomiędzy syntazą a MT. Wykorzystując znakowanie fluorescencyjne stwierdzono ko-lokalizację tego białka z syntazą celulozową obecną w błonie komórkowej oraz w pęcherzykach aparatu Golgiego (Bringmann i in. 2012). Badania przeprowadzone na mutancie *A. thaliana pom2/csi1* wykazały, że tylko 10% cząsteczek syntazy celulozowej u tego mutantu połączone jest z MT, podczas gdy u typu dzikiego jest to aż 94% (Bringmann i in. 2012). U mutantu *pom2/csi1* obserwowano niezależne od układu MT ruchy syntazy w błonie komórkowej. Były one jednak wolniejsze niż u typu dzikiego. Białko POM2/CSII jest więc łącznikiem, który umożliwia ruchy syntazy celulozowej w błonie po torach wyznaczonych przez MT, a ponadto reguluje aktywność i szybkość poruszania się syntazy (Bringmann i in. 2012). Ruchy syntazy celulozowej generują siłę, która oddziałuje na MT, co może prowadzić do zmian w ich układzie, a w konsekwencji także zmian w odkładaniu MF. Można więc przypuszczać, że zachowanie stabilności układu MT jest bardzo ważne dla prawidłowego odkładania MF w ścianie. Liu i współpracownicy (2016) wykazali, że za stabilność układu MT odpowiadają białka z rodziny CMU, które są niemobilne i zlokalizowane punktowo na MT. U mutantu *A. thaliana cmu1cmu2* poruszająca się syntaza celulozowa generowała siłę, która za pośrednictwem białka POM2/CSII oddziaływała na MT, powodując ich przemieszczenie. W konsekwencji u mutantu *cmu1cmu2* zaburzone było odkładanie MF w ścianie, a to prowadziło do zaburzeń wzrostu i skręcenia rzędów komórek epidermy etiolowanego hipokotyla. Białka CMU umożliwiają więc przeciwstawianie się układowi MT korykalnych siłom generowanym przez poruszającą się syntazę celulozową, a w związku z tym utrzymywanie stabilnego układu MT, prawidłowe odkładanie MF w ścianie oraz anizotropowy wzrost komórek (Liu i in. 2016). W warunkach stresu solnego organizację MT oraz funkcjonowanie syntazy celulozowej kontrolują dodatkowo białka CC (Endler i in. 2015). U mutantu *A. thaliana cc1cc2*, w warunkach stresu solnego, komórki etiolowanego hipokotyla były napężniałe, co sugeruje zaburzenia we wzroście wydłużeniowym związane najprawdopodobniej ze zmienionym układem MT oraz MF. Zaś w warunkach optymalnych

hipokotyl mutanta *cc1cc2* wykazywał fenotyp zbliżony do typu dzikiego (Endler i in. 2015). Zatem białka CC pełnią swoją funkcję wyłącznie w warunkach stresu solnego.

Wyniki omówionych powyżej badań wykazują ścisłą zależność układu MF w ścianie komórkowej od układu MT kortykalnych. Są jednak badania, które sugerują, że istnieje także alternatywny mechanizm regulujący odkładanie MF w ścianie. Na przykład długotrwałe traktowanie oryzaliną komórek epidermy hipokotyła *A. thaliana*, które powodowało prawie całkowitą depolimeryzację MT, nie prowadziło do przemieszczania się kompleksów syntazy celulozowej w błonie po przypadkowych torach, ale tory te były wręcz bardziej uporządkowane. Zatem jeśli w cytoplazmie przyściennej obecne są MT, ruchy syntazy celulozowej w błonie są ściśle związane z ich ułożeniem. Natomiast gdy MT ulegną depolimeryzacji, syntaza celulozowa nadal odkłada MF w ścianie w sposób uporządkowany (Paradez i in. 2006). Z kolei badania na komórkach korzenia wykazały, że uporządkowany układ MF nie musi być powiązany z uporządkowanym układem MT. Na przykład w komórkach epidermy korzenia mutanta *A. thaliana mor1-1*, traktowanie podwyższoną temperaturą prowadzi do dezorganizacji układu MT oraz „pęcznienia” komórek i całego korzenia, co wskazuje na wzrost izotropowy, podczas gdy układ MF w ostatnio utworzonych pokładach ściany pozostaje uporządkowany i poprzeczny (prostopadły do długiej osi komórki, czyli także korzenia) (Sugimoto i in. 2003). Na tej podstawie przypuszczano, że po zaburzeniu układu MT w komórkach uporządkowane odkładanie MF polega na odtwarzaniu istniejącego już w ścianie wzoru MF. Dlatego Himmelspace i współpracownicy (2003) przeprowadzili dalsze badania na mutancie *mor1-1*. W pierwszej kolejności siewki mutanta traktowano w temperaturze 21°C inhibitorem syntazy celulozowej DCB (2,6-dichlorobenzonitryl), co powodowało zaburzenia w układzie nowo odkładanych MF w ścianie komórek epidermy korzenia przy zachowaniu uporządkowanego układu MT. Następnie temperaturę podwyższano do 31°C, aby doszło do czasowej reorganizacji poprzecznego układu MT. Tym samym w komórkach korzenia obserwowano równocześnie reorganizację nowo odłożonych MF i MT. Aby sprawdzić, czy mimo to komórki są w stanie odtworzyć uporządkowany układ MF, utrzymując temperaturę 31°C usuwano DCB. Po usunięciu DCB w ścianach pojawiał się uporządkowany układ MF, które były ułożone poprzecznie. Doświadczenie to wykazało, że uporządkowany układ MF może powstać bez udziału MT i utworzonych wcześniej pokładów ściany, co podobnie jak inne doświadczenia wskazuje na istnienie alternatywnego mechanizmu kontrolującego kierunek odkładania MF w ścianie (Himmelspace i in. 2003; Wasteneys 2004).

I.1.2. Zależność właściwości mechanicznych ściany od układu mikrofibril celulozowych.

Dzięki obecności MF ściany komórek roślinnych mogą posiadać anizotropowe właściwości mechaniczne, co ma bardzo duże znaczenie dla wzrostu i kształtu komórki, mechanicznej wytrzymałości tkanek, a także ruchów organów roślinnych (Burgert, Fratzl 2009).

Najwięcej badań nad wpływem orientacji MF na właściwości mechaniczne ściany przeprowadzono na komórkach drewna. Ściana wtórna tych komórek składa się z trzech warstw (S1, S2, S3). Uznaje się, że układ MF w warstwie środkowej (S2), która jest warstwą najgrubszą, warunkuje sztywność całej ściany (Burgert, Fratzl 2009). Badania przeprowadzone na drewnie (Cave 1969; Reiterer i in. 1999) oraz pojedynczych włóknach drzewnych (Burgert i in. 2002; Groom i in. 2002) wykazały, że im mniejszy jest kąt nachylenia mikrofibril względem długiej osi komórki (MFA – *MicroFibril Angle*), tym wyższy jest moduł elastyczności mierzony w tym kierunku, czyli większa sztywność ściany. „Wykorzystując” tę zależność, młode pnie i gałęzie drzew formują drewno młodociane i dorosłe o różnych właściwościach mechanicznych (Hejnowicz 1973). MFA komórek drewna młodocianego jest raczej duży, dlatego jest ono stosunkowo elastyczne wzdłuż osi łożdgi. Natomiast w późniejszych etapach rozwoju zdrewniałe łożdgi drzewa produkują drewno dorosłe, w którym MFA jest raczej niewielki, dzięki czemu ściany są bardziej sztywne, a drzewa opierają się sile wiatru (Lindström i in. 1998; Bonham, Barnett 2001).

Orientacja MF w ścianie komórkowej jest również istotna w procesie tzw. ruchów higroskopowych, jak np. otwieranie łusek szyszki sosny w środowisku suchym i zamykanie w środowisku wilgotnym. Adaksjalna powierzchnia łuski zbudowana jest z włókien sklerenchymatycznych, w których orientacja MF jest prawie podłużna, czyli MF są prawie równoległe do długiej osi komórki i jednocześnie długiej osi łuski (MFA wynosi 0° - $30^{\circ} \pm 2^{\circ}$). Zaś abaksjalna powierzchnia łuski zbudowana jest ze sklereidów, w ścianach których MF zorientowane są prawie poprzecznie, czyli prostopadle do długiej osi komórki i łuski (MFA = $74^{\circ} \pm 5^{\circ}$) (Dawson i in. 1997). Taki układ MF powoduje, że tkanka abaksjalna łuski jest bardziej podatna na rozciąganie w kierunku podłużnym, a tkanka adaksjalna w kierunku poprzecznym. Dlatego, na skutek pęcznienia elementów matriks ściany w środowisku wilgotnym, tkanka abaksjalna wydłuża się w kierunku podłużnym, a tkanka adaksjalna w kierunku poprzecznym i szyszka sosny zamyka się. Natomiast w środowisku suchym tkanka abaksjalna kurczy się w kierunku podłużnym, a adaksjalna w kierunku poprzecznym, dzięki czemu dochodzi do odginania łusek i otwierania szyszki (Burgert, Fratzl 2009; Dawson i in. 1997).

I.1.3. Układ mikrofibril celulozowych oraz właściwości mechaniczne ścian komórek adaksjalnej epidermy łuski cebuli.

Badania zależności mechanicznych właściwości pierwotnych ścian komórkowych od orientacji fibril celulozowych jako jedni z pierwszych prowadzili Kerstens wraz ze współpracownikami (Kerstens i in. 2001; Verbelen, Kerstens 2000). W badaniach tych wykorzystano adaksjalną epidermę łuski cebuli (*Allium cepa*), którą porównywano z abaksjalną epidermą liścia żyworoćki (*Kalanchoe blossfeldiana*). Orientację fibril w ścianie określano w mikroskopie polaryzacyjnym konfokalnym dla tkanek barwionych czerwienią Kongo (Verbelen, Kerstens 2000). W ten sposób wykazano, że ściany komórek epidermy cebuli, wydłużonych wzdłuż osi łuski, mają strukturę anizotropową: fibryle celulozowe są uporządkowane i większość z nich jest zorientowana podłużnie (Kerstens i in. 2001; Suslov, Verbelen 2006). Wyjątek stanowią dwie najstarsze (najbardziej zewnętrzne) łuski cebuli, gdzie orientacja MF w ścianie komórek epidermy jest bardziej zróżnicowana (Suslov, Verbelen 2006). Natomiast ściany komórek epidermy liścia żyworoćki, których kształt przypomina elementy układanki (tzw. *puzzle*), mają strukturę izotropową, czyli fibryle celulozowe nie są uporządkowane (Kerstens i in. 2001). Wpływ różnego układu fibril na właściwości mechaniczne ściany badano porównując naprężenie tych dwóch tkanek towarzyszące takiemu samemu odkształceniu (wydłużeniu) w różnych kierunkach (obliczone z wykorzystaniem ekstensometru). Na tej podstawie wnioskowano o sztywności tkanek: im większe naprężenie, tym większa sztywność. W przypadku żyworoćki nie zaobserwowano różnic w sztywności fragmentów epidermy rozciąganych w różnych kierunkach (epidermę rozciągano w kierunku równoległym lub prostopadłym do nerwu głównego liścia; kierunki te wybrano ze względu na izotropową strukturę ściany i nieregularny kształt komórek). Świadczy to o izotropowych właściwościach mechanicznych ścian o izotropowym układzie fibril celulozowych. Natomiast epiderma cebuli była sztywniejsza w kierunku równoległym do przeważającej orientacji fibril w ścianie niż w kierunku prostopadłym, co świadczy o anizotropowych właściwościach mechanicznych ścian o anizotropowym układzie fibril (Kerstens i in. 2001). Podobny eksperyment, polegający na poddawaniu fragmentów adaksjalnej epidermy cebuli takim samym obciążeniom w różnych kierunkach, również wykazał, że są one mniej podatne na rozciąganie (sztywniejsze) w kierunku równoległym niż prostopadłym do układu MF w ścianie komórkowej (Suslov, Verbelen 2006). Wyniki te zostały potwierdzone przez Vanstreels'a i współpracowników (2005), którzy wykazali, że moduł elastyczności zmierzony podczas rozciągania fragmentu epidermy cebuli w kierunku

podłużnym do długiej osi komórek, czyli zgodnym z ułożeniem fibryl w ścianie, jest większy niż moduł elastyczności zmierzony podczas rozciągania fragmentu epidermy w kierunku poprzecznym. Potwierdza to, że fibryle celulozowe są główną składową ściany odpowiedzialną za wielkość modułu elastyczności.

Badania wykazały także zależność pomiędzy kształtem komórek epidermy a właściwościami mechanicznymi tej tkanki (Vanstreels i in. 2005). Fragmenty epidermy pochodzące z głębszych łusek cebuli, gdzie komórki są mniejsze i mniej wydłużone, przy maksymalnym naprężeniu rozciągającym (przed zerwaniem tkanki) w kierunku podłużnym wydłużają się mniej niż fragmenty epidermy z powierzchniowych łusek cebuli, gdzie komórki są większe i bardziej wydłużone. Badania prowadzono na fragmentach epidermy o tych samych rozmiarach. Ponieważ epiderma z mniejszymi komórkami ma większą gęstość ścian antyklinalnych w przeliczeniu na jednostkę powierzchni, fragmenty epidermy pochodzące z głębszych łusek zawierały więcej ścian komórkowych niż fragmenty pochodzące z powierzchniowych łusek. Mniejsze odkształcenie epidermy łusek wewnętrznych niż zewnętrznych wskazuje na znaczący wpływ ścian komórkowych na właściwości mechaniczne całej epidermy (Vanstreels i in. 2005).

I.2. Naprężenia ściany komórkowej.

Występujące w ścianach komórkowych oraz tkankach i organach roślinnych naprężenia mają bardzo duże znaczenie dla wzrostu rośliny, regulacji morfogenezy i funkcjonowania organów. W ścianie żywych komórek *in situ* występuje naprężenie rozciągające wynikające bezpośrednio z turgoru. Na naprężenie takie nałożone są często tzw. naprężenia tkankowe. Dlatego całkowite naprężenie w ścianie komórek roślinnych *in situ* jest sumą naprężenia wynikającego z turgoru oraz naprężenia tkankowego (Hejnowicz 1997). Naprężenie rozciągające ściany komórkowej jest szczególnie ważne dla właściwości mechanicznych organów roślin zielnych, zbudowanych z tzw. tkanek zielonych, których sztywność uwarunkowana jest turgorem. Świadczy o tym wędnięcie roślin przy niedostatku wody.

I.2.1. Naprężenie wynikające bezpośrednio z turgoru.

Ściana każdej żywej komórki w stanie turgoru poddana jest naprężeniu rozciągającemu w płaszczyźnie ściany. Naprężenie to nie zanika po izolacji komórek z organu. Jego wielkość zależy od ciśnienia turgorowego, grubości ściany, kształtu komórki

oraz kierunku, w którym naprężenie jest mierzone. Wielkość naprężenia w danym kierunku można obliczyć korzystając ze wzoru (1) (Hejnowicz 1997).

$$(1) \quad \sigma_w = PA_c/A_w$$

, gdzie σ_w – naprężenie w ścianie wynikające z turgoru, P- ciśnienie turgorowe, A_c - pole powierzchni przekroju przez komórkę w płaszczyźnie poprzecznej do kierunku, w którym obliczane jest naprężenie, A_w - pole powierzchni przekroju przez ścianę komórki

W ścianie izolowanej komórki sferycznej (izodiametrycznej), której promień wynosi r , a grubość ściany d , naprężenie (σ_w) we wszystkich kierunkach jest jednakowe i wyraża się wzorem (2). Zaś w ścianie izolowanej komórki cylindrycznej, wynikające z turgoru naprężenie w kierunku podłużnym (σ_{wL} ; wzór (3)) jest inne niż w kierunku poprzecznym (σ_{wT} ; wzór (4)) (Hejnowicz 1997; 1999).

$$(2) \quad \sigma_w = Pr/2d$$

$$(3) \quad \sigma_{wL} = Pr/2d$$

$$(4) \quad \sigma_{wT} = Pr/d$$

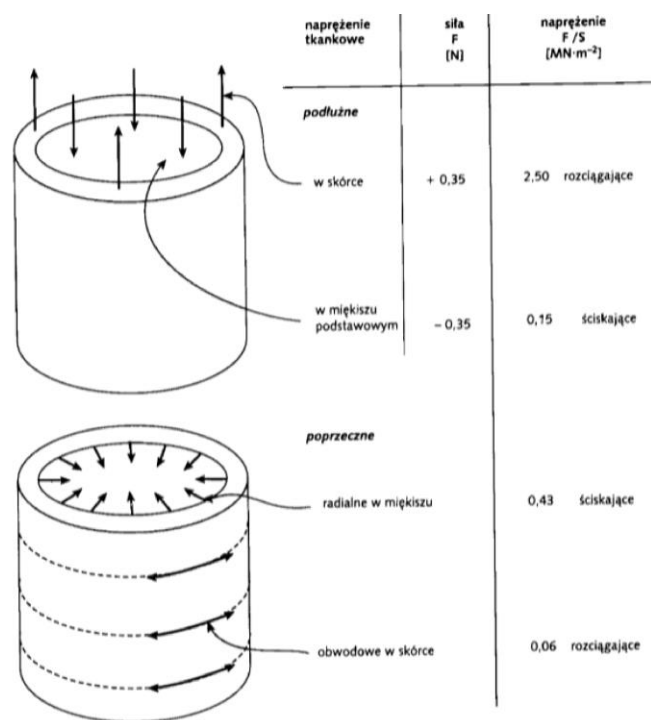
Zatem w ścianie izolowanej komórki cylindrycznej, wynikające z turgoru naprężenie w kierunku poprzecznym jest dwa razy większe od naprężenia w kierunku podłużnym (Hejnowicz 1997). Oznacza to, że naprężenie ściany jest anizotropowe, czyli różni się w różnych kierunkach w danym punkcie ściany. Anizotropię naprężenia ściany komórkowej charakteryzuje się zwykle podając stosunek naprężenia w kierunku podłużnym do naprężenia w kierunku poprzecznym (Hejnowicz 1997; 1999).

Podsumowując, w komórkach izolowanych będących w stanie turgoru anizotropia naprężenia w ścianie zależy od ich kształtu. W izolowanej komórce izodiametrycznej stosunek naprężeń wynosi 1:1, ponieważ w ścianie takiej komórki naprężenie we wszystkich kierunkach jest jednakowe. Natomiast w izolowanej komórce cylindrycznej stosunek naprężeń wynosi 1:2, co oznacza, że naprężenie w kierunku poprzecznym jest dwa razy większe od naprężenia w kierunku podłużnym (Hejnowicz 1997;1999).

I.2.2. Naprężenia tkankowe.

Jak wspomniano powyżej, na naprężenie ściany wynikające bezpośrednio z turgoru nałożone mogą być naprężenia tkankowe, które działają wyłącznie w ścianach komórek *in situ*, czyli znikają po izolacji tkanki z organu (Hejnowicz 1997).

Naprężenia tkankowe występują m.in. w organach cylindrycznych, których sztywność uwarunkowana jest turgorem, jak łodygi roślin zielnych lub hipokotyle, i są konsekwencją różnic w grubości ścian komórkowych, kształcie oraz rozmiarach komórek budujących zewnętrzne i wewnętrzne tkanki organu (Hejnowicz 1999). Jeśli turgor w komórkach takich różnych tkanek jest zbliżony, to naprężenie w ich ścianach wynikające z turgoru będzie różne, a w konsekwencji różne będą również siły działające na poziomie całych tkanek *in situ*. Zatem w takim organie tkanka zbudowana z komórek o grubszych ścianach i mniejszej średnicy jest w stanie rozciągającego naprężenia tkankowego, a tkanka zbudowana z komórek o cieńszych ścianach i większej średnicy – naprężenia ściskającego (Hejnowicz 1999). Przykładem organu, w którym występują naprężenia tkankowe, jest hipokotyl słonecznika, w którego epidermie występuje duże naprężenie rozciągające w kierunku podłużnym, a w tkankach wewnętrznych niewielkie naprężenie ściskające w kierunku podłużnym (Ryc.I.2.1). W hipokotylu słonecznika występują również nieznaczne naprężenia tkankowe w kierunku poprzecznym: obwodowe w epidermie oraz radialne w miękiszu (Ryc.I.2.1) (Hejnowicz 1997; 1999; 2012).

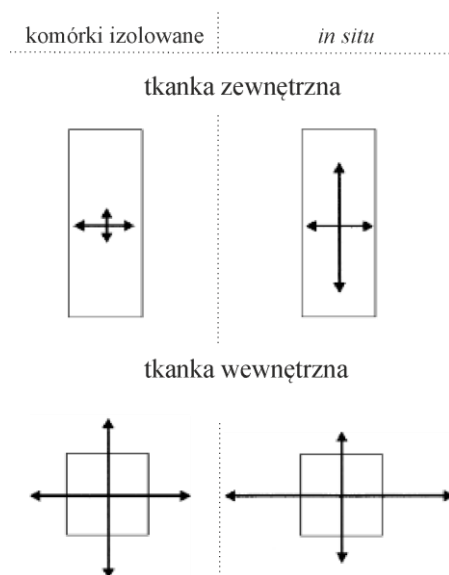


Ryc.I.2.1. Rozkład naprężeń tkankowych oraz odpowiadające im siły w hipokotylu słonecznika (Hejnowicz 2012).

W organach o kształcie cylindrycznym, jak łodyga i hipokotyl, kierunek podłużny i poprzeczny do długiej osi komórki to jednocześnie odpowiednio kierunek podłużny i poprzeczny organu. Ponieważ w ścianach komórkowych naprężenia tkankowe sumują się

z naprężeniami wynikającymi bezpośrednio z turgoru, anizotropia naprężeń ściany *in situ* jest inna niż w izolowanych komórkach o identycznym kształcie. Przykładowo, jeśli tak jak w hipokotylu słonecznika tkanka zewnętrzna zbudowana jest z cylindrycznych komórek o grubych ścianach i małej średnicy, natomiast tkanka wewnętrzna zbudowana jest z komórek izodiametrycznych o cienkich ścianach i dużej średnicy, a ciśnienie turgorowe w komórkach obu tkanek jest takie samo, to (Hejnowicz 1997; 1999):

- (i) w komórkach cylindrycznych tkanki zewnętrznej na wynikające z turgoru naprężenie rozciągające o anizotropii 1:2 (naprężenie w kierunku podłużnym : poprzecznym) nałożone jest naprężenie tkankowe o znacznie większej i odwróconej anizotropii (naprężenie rozciągające w kierunku podłużnym jest znacznie większe niż w kierunku poprzecznym); w konsekwencji anizotropia naprężenia *in situ* jest większa od 1 (Ryc.I.2.2)
- (ii) w komórkach izodiametrycznych tkanki wewnętrznej na wynikające z turgoru naprężenie rozciągające o anizotropii zbliżonej do 1 nałożone jest niewielkie naprężenie tkankowe ściskające w kierunku podłużnym, co prowadzi do zmniejszenia naprężenia w kierunku podłużnym i zwiększenia w kierunku poprzecznym (efekt Poisson); w konsekwencji anizotropia naprężenia *in situ* jest mniejsza od 1 (Ryc.I.2.2).



Ryc.I.2.2. Anizotropia naprężeń w ścianach komórek budujących tkankę zewnętrzną (komórki cylindryczne) oraz wewnętrzną (komórki izodiametryczne) organu cylindrycznego *in situ*, kiedy na naprężenia wynikające z turgoru nałożone są naprężenia tkankowe, oraz po izolacji z organu (Hejnowicz 1997; 1999).

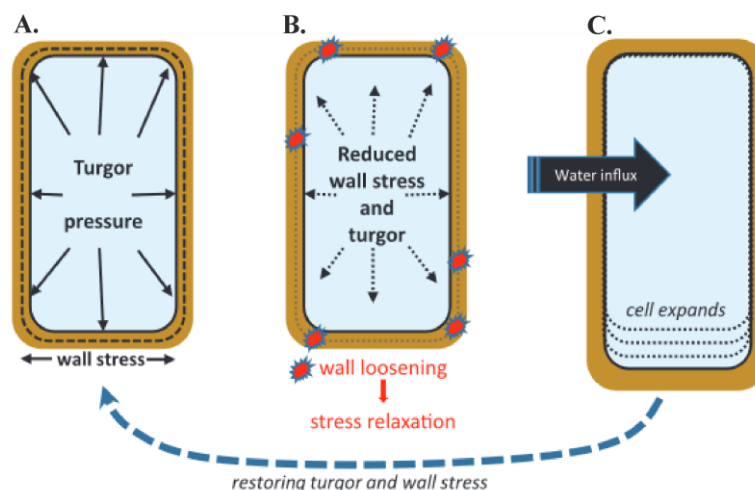
Naprężenia tkankowe odwracają więc anizotropię naprężenia wynikającego bezpośrednio z turgoru komórki. Zależność ta jednak może być inna, jeśli moduły elastyczności ścian komórkowych poszczególnych tkanek nie są takie same.

I.3. Odkształcenia ściany żywych komórek.

Ściany komórek roślinnych mogą zmieniać swój kształt i rozmiar na skutek odkształcenia elastycznego, wiskoelastycznego oraz plastycznego. Odkształcenie elastyczne jest procesem odwracalnym, czyli po usunięciu siły, która spowodowała odkształcenie, ciało powraca do swojego pierwotnego kształtu (Proseus i in. 1999). W przypadku ścian komórkowych odkształcenie elastyczne zachodzi głównie na skutek zmian ciśnienia turgorowego, które przykładowo maleje, gdy komórka oddaje wodę (Proseus i in. 1999; Cosgrove 2016). Odkształcenie plastyczne jest natomiast procesem nieodwracalnym, który ma miejsce, gdy siła powodująca odkształcenie jest tak duża, że przekroczone zostaje maksymalne naprężenie materiału i w jego strukturze zachodzą nieodwracalne zmiany (Proseus i in. 1999; Hejnowicz 2012). Odkształceniem plastycznym jest wzrost komórki, który zachodzi, gdy zmieniają się właściwości ściany, polegające na rozluźnieniu jej struktury (Hejnowicz 2012; Cosgrove 2016). Przykładowo fragmenty adaksjalnej epidermy cebuli składające się z komórek o podłużnej orientacji MF w ścianie, które rozciągano w ekstensometrze zarówno w kierunku równoległym jak i prostopadłym do orientacji MF, po nagłym zniesieniu tego naprężenia natychmiast odkształcały się elastycznie (kurczyły się), ale nawet po dłuższym czasie nie powracały już do swojej długości wyjściowej (długości przed rozciąganiem), co świadczy o tym, że ściany odkształcały się również plastycznie (Suslov, Verbelen 2006). Szczególnym przypadkiem odkształceń jest odkształcenie wiskoelastyczne, które polega na tym, że po usunięciu siły ciało powraca częściowo lub całkowicie do pierwotnego kształtu, ale z pewnym opóźnieniem. Odkształcenie wiskoelastyczne ściany komórkowej jest odkształceniem nieodwracalnym, które najprawdopodobniej spowodowane jest reorganizacją elementów budujących ścianę następującą po zmianie turgoru, które nie wracają do pierwotnego stanu po przywróceniu wyjściowego turgoru (Proseus i in. 1999; Burian 2007). Przykładem odkształcenia wiskoelastycznego jest „płynięcie” ścian (*creep*), które polega na powolnym odkształceniu/wydłużaniu ściany przy stałym naprężeniu. Badania wykazały, że „płynięcie” ścian było większe, gdy fragmenty adaksjalnej epidermy cebuli rozciągane były w kierunku prostopadłym niż równoległym do orientacji MF (Suslov, Verbelen 2006).

I.3.1. Wzrost komórek roślinnych – plastyczne odkształcenie ściany komórkowej.

Wzrost komórki roślinnej rozpoczyna się rozluźnieniem struktury ściany (Ryc.I.3.1.B), które prowadzi do relaksacji naprężenia w ścianie oraz zmniejszenia turgoru. Umożliwia to pobranie wody przez komórkę i w konsekwencji zwiększenie jej rozmiarów (Ryc.I.3.1.C) oraz przywrócenie turgoru i naprężeń w ścianie (Ryc.I.3.1.A) (Cosgrove 2016). Takie powtarzające się cyklicznie etapy prowadzą do stopniowego zwiększania objętości komórki i powierzchni ściany. Stopniowe powiększanie się rozmiarów komórki wymaga jednocześnie odkładania nowych elementów ściany, aby ciągłość i grubość ściany zostały zachowane. Wzrost komórki jest więc odkształceniem plastycznym otaczającej ją ściany (Proseus i in. 1999; Veytsman, Cosgrove 1998; Cosgrove 2016).



Ryc.I.3.1. Wzrost komórki roślinnej (Cosgrove 2016). **A** - nierosnąca komórka w stanie turgoru, której ściany są naprężone; **B** – rozluźnienie ściany komórkowej skutkujące zmniejszeniem naprężenia w ścianie oraz turgoru, przy zachowanych rozmiarach komórki; **C** – pobieranie wody przez komórkę prowadzące do elastycznego rozciągania ściany, odtworzenia naprężenia w ścianie oraz turgoru.

Pierwszy etap wzrostu komórki, czyli rozluźnienie ściany (Ryc.I.3.1.B), zwiększa podatność komórki na odkształcenia. Rozluźnienie struktury ściany następuje poprzez reorganizację polimerów, będących nośnikami naprężenia w ścianie (Cosgrove 2016). Proces ten zachodzi przy udziale ekspansyn, białek zaangażowanych w rozrywanie wiązań wodorowych pomiędzy polisacharydami w ścianie (Cosgrove 1997). Ekspansyny są aktywne i powodują rozluźnienie ściany komórkowej wyłącznie w komórkach rosnących, w środowisku kwaśnym (McQueen-Mason i in. 1992). W komórkach *in situ* niskie pH ściany zapewniane jest przez H^+ -ATPazę (Haruta i in. 2015), której wzmożoną aktywność

zaobserwowano podczas odkształcenia elastycznego komórek (patrz podrozdział I.3.2). Prawdopodobnie enzymem regulującym proces rozluźniania ściany jest również endotransglikozylaza ksyloglukanu (XET – *xyloglucan endotransglycosylase*) (Cosgrove 1997; Verbelen i in. 2001). Enzym ten odpowiada za rozrywanie wiązań pomiędzy łańcuchami ksyloglukanu, uznawanego za jeden z najważniejszych łączników MF w ścianie, który równocześnie minimalizuje ich bezpośrednie przyleganie (Cosgrove 1997; Park, Cosgrove 2012; Xiao i in. 2016). Podobnie jak w przypadku ekspansyn, aktywność XET jest ściśle związana ze wzrostem komórek: wysoka w komórkach młodych, rosnących i niska w komórkach dojrzałych, nierosnących (Verbelen i in. 2001). Mutant *A. thaliana xxt1/xt2*, który charakteryzuje się przede wszystkim brakiem ksyloglukanu w ścianie, ma równocześnie zwiększoną rozciągliwość ścian komórek ogonka liściowego w porównaniu do typu dzikiego, co sugeruje, że aktywność XET może regulować rozciągliwość ściany (Park, Cosgrove 2012; Xiao i in. 2016). Sama obecność XET nie jest jednak wystarczająca do zwiększenia rozciągliwości ścian komórkowych (McQueen-Mason i in. 1993). Najprawdopodobniej aktywność XET regulowana jest na drodze bardziej skomplikowanego mechanizmu, który być może powiązany jest z aktywnością ekspansyn. W odpowiedzi na obniżenie pH oraz podanie egzogennej ekspansyny ściany komórek typu dzikiego osiągały bowiem większą rozciągliwość niż mutantu *xt1/xt2*, co wskazuje, że aktywność XET reguluje w jakiś sposób aktywność ekspansyn (Park, Cosgrove 2012).

Niezależnie od mechanizmu, który je powoduje, rozluźnienie ściany jest konieczne do wzrostu. Zarówno ekspansyny jak i XET wykazywały wzmożoną aktywność w komórkach rosnących (McQueen-Mason i in. 1992; Verbelen i in. 2001). To sugeruje, że do rozluźnienia struktury ściany zdolne są wyłącznie rosnące jeszcze komórki. Odkształcenie elastyczne, wynikające ze zmian turgoru, obserwowano natomiast zarówno w komórkach rosnących, jak i nierosnących (Proseus i in. 1999).

I.3.2. Odkształcenie elastyczne ściany a wzrost komórki.

Ściana rosnących komórek ulega równocześnie odkształceniu plastycznemu i elastycznemu, a oba z nich zależą od turgoru. W związku z tym bardzo trudno jest analizować te dwa typy odkształceń osobno. Proseus i współpracownicy (1999) jako jedni z pierwszych przeprowadzili eksperyment, w którym możliwe było wyodrębnienie wzrostu od odkształcenia wiskoelastycznego i elastycznego ściany komórkowej. Badania polegały na iniekcji (zwiększenie ciśnienia turgorowego) lub usunięciu części (zmniejszenie ciśnienia turgorowego) soku komórkowego z wyizolowanej komórki międzywęźla ramienicy *Chara*

corallina przy jednoczesnym monitorowaniu długości komórki. Wykazano, że odkształcenie elastyczne wynikające ze zmiany ciśnienia turgorowego może zachodzić niezależnie od wzrostu. Komórki młode, zdolne do wzrostu, trzymane w niskiej temperaturze (7,3°C), w której ich wzrost był zahamowany, reagowały na zmniejszenie oraz zwiększenie turgoru odpowiednio zmniejszeniem lub zwiększeniem długości. W optymalnej dla wzrostu temperaturze (23°C) komórki młode również zmieniały długość w odpowiedzi na modyfikację ciśnienia. Jednak w temperaturze optymalnej dla wzrostu przez cały czas eksperymentu komórki także rosły. Szybkość wzrostu zmniejszała się przy ciśnieniu turgorowym niższym niż optymalne. W komórkach dojrzałych (nierosnących) skokowe zmiany ciśnienia turgorowego skutkowały zmianami długości komórki, która następnie utrzymywała się na stałym poziomie. Komórka, w której utrzymywano najpierw wysokie ciśnienie, po jego gwałtownym zmniejszeniu gwałtownie zmniejszała długość. Po zwiększeniu ciśnienia do wartości początkowej, długość komórki zwiększała się najpierw gwałtownie, a następnie wolniej, by w ostateczności osiągnąć długość trochę większą niż w stanie wyjściowym, co nazywane jest odkształceniem wiskoelastycznym. Podobne odkształcenie wiskoelastyczne towarzyszyło wzrostowi ciśnienia w komórkach młodych. W optymalnej temperaturze było jednak słabiej widoczne ze względu na zachodzący równocześnie wzrost komórek (Proseus i in. 1999). Badania wykazały, że odkształcenie elastyczne będące skutkiem modyfikacji ciśnienia turgorowego jest niezależne od wzrostu komórki, ponieważ zachodzi zarówno w komórkach rosnących jak i nierosnących. Niemniej jednak odkształcenie elastyczne, jako nieodzowna konsekwencja zmiany ciśnienia turgorowego, jest częścią kompleksowej odpowiedzi komórki, która łączy odkształcenie elastyczne, wiskoelastyczne oraz plastyczne powodując wzrost komórek (Proseus i in. 1999).

Znaczenie turgoru jako czynnika niezbędnego do wzrostu komórek potwierdzają również badania przeprowadzone na mutancie *A. thaliana det3*, który ma mutację w genie kodującym podjednostkę C wakuolarnej H⁺-ATPazy (V-ATPazy) (Schumacher i in. 1999). V-ATPaza reguluje napływ jonów H⁺ do wakuoli, powodując jej zakwaszenie. Prawdopodobnie u mutantu *det3* transport H⁺ do wakuoli jest zmniejszony, przez co jej pH jest zwiększone w porównaniu do typu dzikiego (Smart i in. 1998; Schumacher i in. 1999; Schumacher, Krebs 2010). Równocześnie wiadomo, że akwaporyny (białka znajdujące się w błonie komórkowej oraz tonoplaście), które odpowiadają za transport wody przez błonę, są wrażliwe na zmiany pH (Paluch i in. 2015). Dlatego można przypuszczać, że zaburzenia funkcjonowania V-ATPazy wpływają na zmiany turgoru w komórkach. U mutantu *det3* zaobserwowano znaczące zmniejszenie wydłużania komórek hipokotyla, ogonków liściowych

i pędów kwiatostanowych, będące skutkiem zaburzenia odpowiedzi na brasinosteroidy oraz w mniejszym stopniu na auksynę. Ponieważ oba hormony regulują wzrost wydłużeniowy, wynik ten sugeruje, że wydłużanie komórek jest związane z turgorem, który w komórce może być regulowany na drodze różnych mechanizmów wykorzystujących pompy wakuolarne (w tym H^+ -ATPazy) oraz hormony (Schumacher i in. 1999; Martin i in. 2001). Zwiększona aktywność błonowej oraz wakuolarnej H^+ -ATPazy występuje także podczas fazy intensywnego wydłużania trichomów bawełny (*Gossypium hirsutum*) (Smart i in. 1998). Badania innych autorów wykazały natomiast tymczasową utratę połączenia symplazmowego między komórkami podczas fazy intensywnego wydłużania trichomów bawełny (Ruan i in. 2001). Również badania przeprowadzone na korzeniu *A. thaliana* wykazały brak połączenia symplazmowego pomiędzy komórkami epidermy w strefie różnicowania, w której powstają włosniki (Duckett i in. 1994). Być może symplazmowa izolacja komórek umożliwia lokalny wzrost ciśnienia turgorowego w komórkach, z których powstają włosniki oraz w trichomach bawełny (Martin i in. 2001).

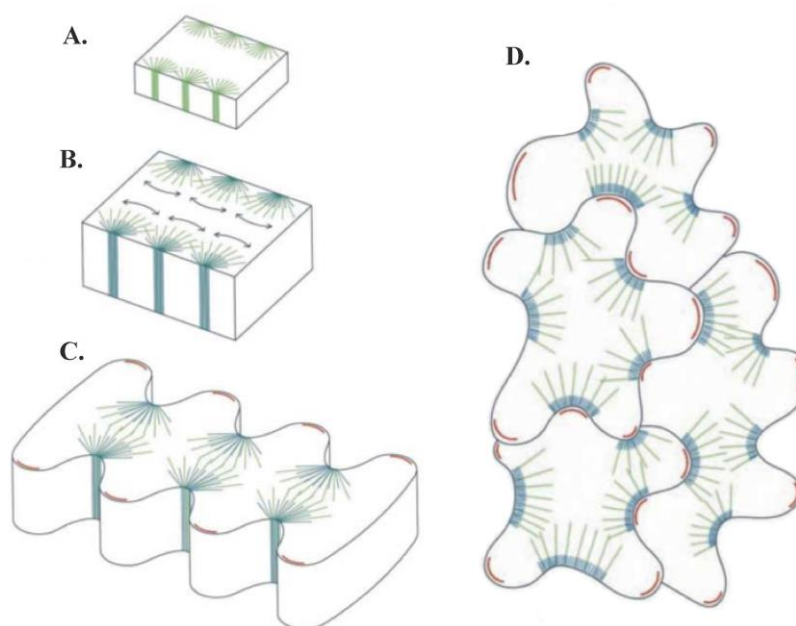
I.3.3. Zależność wzrostu od układu fibryl celulozowych w ścianie.

Związek pomiędzy wzmocnieniem ściany przez fibryle celulozowe a wzrostem komórek jako pierwszy zaobserwował Green (1962). Wykazał on, że traktowanie młodych rosnących komórek międzywęźli ramienicy *Nitella* kolchicyną zaburza ich wzrost. W warunkach normalnych komórki te mają cylindryczny kształt i charakteryzują się wzrostem anizotropowym oraz zorganizowanym, poprzecznym układem MF w ścianie komórkowej. Natomiast traktowanie kolchicyną prowadziło do wzrostu izotropowego ściany oraz zaburzenia w układzie MF, co skutkowało owalnym kształtem komórek (Green 1962). Wprawdzie cytoszkielecik tubulinowy opisano dopiero kilka lat później, wiadomo było jednak, że kolchicyna hamuje tworzenie wrzeciona kariokinetycznego i w konsekwencji powoduje zaburzenia kariokinezy. Na tej podstawie Green (1962) postulował, że włókna, podobne do tych tworzących wrzeciono kariokinetyczne, wpływają na układ MF, a przez to na anizotropię wzrostu komórki.

Słuszność przypuszczeń Greena (1962) dotyczących zależności pomiędzy MF a włóknami podobnymi do tych budujących wrzeciono kariokinetyczne, czyli MT, potwierdziły ostatecznie omówione już przeprowadzone wiele lat później badania (patrz podrozdział I.1). Poniżej omówiono natomiast badania wskazanej przez Greena zależności pomiędzy układem MF w ścianach komórek a anizotropią wzrostu. Układ MF w kolejnych pokładach ściany może się różnić, dlatego w rozważaniach istotne jest doprecyzowanie, czy

chodzi: (i) o mierzony z wykorzystaniem mikroskopu polaryzacyjnego układ MF na całej grubości ściany, czyli we wszystkich jej pokładach, wyrażany jako MFA; czy też (ii) o układ MF wyłącznie w najmłodszym (wewnętrznym) pokładzie ściany, położonym od strony protoplastu. W ścianie komórek epidermy zawiązków liścia *A. thaliana* układ MF na całej grubości ściany był prostopadły do kierunku maksymalnego wzrostu tych komórek (MFA bliski 90°). Prostopadły do kierunku wzrostu układ MF na całej grubości ściany występował także w komórkach epidermy strefy wydłużania oraz wierzchołka korzenia *A. thaliana*. Natomiast w dalszych partiach korzenia, gdzie występują komórki starsze, układ MF w ścianie komórek epidermy zmieniał się na coraz bardziej losowy (Verbelen, Kerstens 2000). Z kolei w ścianie rosnących komórek, które mają nieregularny, przypominający puzzle kształt, takich jak adaksjalna i abaksjalna epiderma liścia żyworódki (*Kalanchoe blossfeldiana*) oraz adaksjalna epiderma liścia roszponki (*Valerianella locusta*) układ MF na całej grubości ściany był losowy (Verbelen, Kerstens 2000; Verbelen i in. 2001; Kerstens i in. 2001). Układ prostopadły do kierunku maksymalnego wzrostu komórek zaobserwowano tylko w tych komórkach epidermy liścia roszponki, które przykrywały nerwy liściowe, jednak w starszych liściach zmieniał się on na równoległy (Verbelen, Kerstens 2000). Również z badań przeprowadzonych dla komórek adaksjalnej epidermy cebuli, które charakteryzują się podłużnym układem MF (MFA bliski 0°) w zewnętrznej ścianie peryklinalnej, wynika, że maksymalny kierunek wzrostu komórek jest prostopadły do orientacji MF w ścianie. Z badań tych wynika także, że zależność pomiędzy MFA a wzrostem i kształtem komórek istnieje zwłaszcza w komórkach młodych, intensywnie rosnących (Suslov, Verbelen 2006).

Zależność wzrostu od lokalnego układu MF w ścianie jest wyraźna podczas formowania się przypominającego puzzle kształtu komórek podstawowych epidermy liścia *A. thaliana*. W młodej komórce epidermy liścia wiązki MT równoległe do ściany antyklinalnej przebiegają w kierunku prostopadłym do powierzchni liścia, a na styku ściany antyklinalnej i peryklinalnej łączą się z radialnie ułożonymi MT pod ścianą peryklinalną (Ryc.I.3.2.A). Równoległe do układu MT odkładane są MF w ścianie komórkowej (Ryc.I.3.2.B). Podczas wzrostu komórki układ MF, które wzmacniają ścianę, powoduje, że ściana peryklinalna wydłuża się wzdłuż „łuków” wskazanych strzałkami na Ryc.I.3.2.B. Ściana antyklinalna natomiast rośnie bardziej w miejscach, w których nie występują wiązki MF, przez co rosnąca komórka przyjmuje przypominający puzzle kształt (Ryc.I.3.2.C). Dojrzała komórka składa się więc z uwypukleń oraz przewężeń tworzących ponadkomórkowy wzór przypominający układankę (Ryc.I.3.2.D) (Panteris, Galatis 2005).



Ryc.I.3.2. Formowanie przypominającego puzzle kształtu komórek epidermy liścia *A. thaliana*. Kolorem zielonym zaznaczono mikrotubule (MT), niebieskim - mikrofibryle celulozowe (MF), czerwonym - filamenty aktynowe (Panteris, Galatis 2005).

Zależność pomiędzy anizotropią układu MF a anizotropią wzrostu nie jest jednak jednoznaczna. Badania innych autorów wykazały, że możliwy jest wzrost wydłużeniowy komórek przy równoczesnym podłużnym, czyli równoległym do kierunku wzrostu układzie MF zarówno na całej grubości ściany, jak i na powierzchni najmłodszego jej pokładu. Już w 1981 roku Takeda i Shibaoka zaobserwowali, że na wewnętrznej powierzchni zewnętrznej ściany wydłużających się komórek epidermy epikotyła fasoli azuki (*Vigna angularis*) układ MF może być zarówno poprzeczny, skośny jak i podłużny. Inne badania wykazały zaś, że w początkowych etapach wydłużania organów, takich jak międzywęźla grochu, pędy kwiatostanowe mniszka lekarskiego, hipokotyl soi, mezokotyl oraz koleoptyl owsa, układ MF zmierzony na całej grubości zewnętrznej ściany komórek epidermy jest poprzeczny, a następnie przechodzi w podłużny. Nie powoduje to jednak zaburzenia wzrostu wydłużeniowego tych komórek (Paolillo 2000). Równoległy do kierunku wzrostu komórki układ MF na całej grubości ściany zaobserwowano również w ścianie komórek epidermy hipokotyli *A. thaliana*, które charakteryzują się wzrostem wydłużeniowym (Verbelen, Kerstens 2000). Zaś inne badania, przeprowadzone na rosnących komórkach epidermy etiolowanego hipokotyli *A. thaliana*, wykazały, że orientacja MT oraz kierunek ruchów syntazy celulozowej są przejściowo poprzeczne, a następnie zróżnicowane w zewnętrznej

ścianie peryklinalnej, podczas gdy w ścianie wewnętrznej przez cały czas są poprzeczne (Crowell i in. 2011). Zróznicowanie kierunku ruchów syntazy celulozowej, które skutkuje zróżnicowaniem układu MF w najmłodszym pokładzie ściany komórkowej, zaobserwowano również w zewnętrznej ścianie rosnących komórek epidermy hipokotyła *A. thaliana* rosnącego na świetle (Chan i in. 2010). Z dalszych badań wynika zaś, że zaburzenie poprzecznego układu MT, a w związku z tym również kierunku odkładania MF w wewnętrznej ścianie komórek epidermy, prowadzi do zaburzenia wzrostu wydłużeniowego tych komórek (Crowell i in. 2011). Kierunek wzrostu jest więc najprawdopodobniej regulowany przez układ MF w wewnętrznej ścianie komórek epidermy.

Orientacja MF w ścianie wydłużających się komórek jest więc często podłużna. W związku z tym, można przypuszczać, że orientacja MF w ścianie nie jest jedynym czynnikiem określającym anizotropię wzrostu. W ścianie komórek rosnących anizotropowo występują naprężenia, których rozkład również jest anizotropowy. Przykładowo, jak już wcześniej opisano (patrz podrozdział I.2.), w ścianach cylindrycznych komórek tkanki zewnętrznej (epidermy) organów cylindrycznych, takich jak łodyga, *in situ* naprężenie rozciągające w kierunku podłużnym jest większe niż naprężenie rozciągające w kierunku poprzecznym. Mimo że w ścianach tych komórek orientacja MF często jest podłużna, charakteryzują się one wzrostem wydłużeniowym, który jest możliwy dzięki dużemu naprężeniu rozciągającemu w kierunku podłużnym występującemu w ścianach tych komórek (Baskin 2005; Baskin, Jensen 2013). Wzrost komórek może więc być regulowany zarówno przez anizotropię naprężenia jak i orientacji MF w ścianie, ale mechanizm tego procesu nie został jeszcze całkowicie poznany. Istnieją przypuszczenia, że regulacja wzrostu zachodzi na drodze mechanizmu sprzężenia zwrotnego: MT orientują się równolegle do kierunku maksymalnego naprężenia ściany, wyznaczając tym samym kierunek odkładania MF w ścianie, co prowadzi do wzrostu komórki w kierunku prostopadłym do kierunku maksymalnego naprężenia. Rozkład naprężeń w ścianie, który jest istotny dla mechanizmu sprzężenia zwrotnego, może być natomiast powiązany również z innymi niż MF elementami ściany, przykładowo pektynami, które wpływają na sztywność ściany, a w związku z tym na jej naprężenie (Bidhendi, Geitmann 2016).

I.3.4. Ciśnienie turgorowe, właściwości mechaniczne ściany a kształt i rozmiary komórki.

Podobnie jak w przypadku zamkniętego naczynia o elastycznych ścianach wypełnionego płynem będącym pod ciśnieniem, kształt żywej komórki roślinnej zależy od turgoru, czyli ciśnienia hydrostatycznego wypełniającego płynu, i właściwości

mechanicznych ściany. Dlatego zmianie turgoru towarzyszy elastyczne odkształcenie ścian komórki i, co za tym idzie, zmiana jej kształtu i rozmiarów. Im mniej sztywna jest ściana, tym silniej komórka się odkształca (Zimmermann 1978). Oznacza to, że większe odkształcenia towarzyszące zmianie turgoru na skutek traktowania osmotycznego zachodzą w komórkach młodych i rosnących, których ściany są cieńsze i bardziej elastyczne, niż w nierosnących komórkach dojrzałych o grubszych i mniej elastycznych ścianach. Dlatego na przykład zmianie roztworu hipotonicznego na hipertoniczny towarzyszą stosunkowo duże odkształcenia powierzchniowe zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek merystemu apikalnego pędu pomidora, których ściany są cienkie i elastyczne (Kierzkowski i in. 2012).

Badania eksperymentalne i modelowanie zależności odkształcenia ściany komórkowej od kształtu komórki i właściwości mechanicznych ściany są dużym wyzwaniem ze względu na zwykle złożone i asymetryczne kształty komórek oraz trudności techniczne z pomiarem modułu elastyczności w płaszczyźnie ściany. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem CFM (*Cellular Force Microscopy*), narzędzia łączącego mikroindentację z mikroskopią sił atomowych, pozwalają wyznaczyć tzw. pozorną sztywność ściany komórkowej (Routier-Kierzkowska i in. 2012; Weber i in. 2015). Pojęcie pozornej sztywności ścian można wytłumaczyć na przykładzie gumowego balona, który trudniej poddaje się lokalnemu odkształceniu, czyli pozorna sztywność jego ścian jest duża, gdy jest całkowicie napompowany, a łatwiej, gdy jest słabo napompowany (pozorna sztywność jest mała). Pomiary w CFM pokazały, że zarówno w tkance o prostej budowie (epiderma adaksjalna łuski cebuli), jak i w izolowanych, pojedynczych komórkach o prostej geometrii (hodowane w zawiesinie komórki tytoniu (*Nicotiana tabacum*) linii Bright Yellow-2 (BY-2)) pozorna sztywność ścian zwiększa się wraz z ciśnieniem turgorowym komórek (Routier-Kierzkowska i in. 2012; Weber i in. 2015). Badania hodowanych w zawiesinie pojedynczych komórek tytoniu BY-2, które charakteryzują się cylindrycznym kształtem, wykazały, że znacznie mniejszej siły trzeba użyć, aby uzyskać takie samo lokalne odkształcenie ściany komórki, którą wcześniej inkubowano w 0,2M mannitolu (roztwór izotoniczny) niż komórki inkubowanej w wodzie (roztwór hipotoniczny). Oznacza to, że im mniejsze ciśnienie turgorowe w komórce, tym mniejsza pozorna sztywność jej ściany (Weber i in. 2015). Badając komórki tytoniu BY-2 stwierdzono także, że plazmolizie komórek inkubowanych wcześniej w roztworze izotonicznym towarzyszyło mniejsze kurczenie w kierunku podłużnym niż w przypadku komórek, które przed plazmolizą inkubowano w wodzie. Kurczenie komórek w kierunku podłużnym w obu przypadkach było większe niż w kierunku poprzecznym, co świadczy o zwiększonej sztywności ściany wzdłuż obwodu komórki (Weber

i in. 2015). Jest to najprawdopodobniej konsekwencją układu MF, które początkowo ułożone są w ścianie komórek BY-2 losowo, ale już po 2 dniach od założenia kultury układają się w kierunku poprzecznym (Nagata i in. 1992). Zatem anizotropia odkształcenia towarzyszącego plazmolizie zależy od anizotropii układu MF w ścianie.

Z badań na komórkach BY-2 wiadomo również, że im większy jest promień komórki, tym większej siły trzeba użyć, aby uzyskać to samo odkształcenie ściany (Weber i in. 2015). Do innych wniosków doprowadziło modelowanie, w którym badano, jak geometria i rozmiar komórki, grubość jej ściany oraz promień kulki używanej do mikroindentacji wpływają na pozorną sztywność ściany (Bolduc i in. 2006). Modelowanie przeprowadzono dla łagiewki pyłkowej, która charakteryzuje się cylindrycznym kształtem, a na jej wzrost nie mają wpływu komórki sąsiadujące. Wykazano, że im większy promień łagiewki, tym mniejszej siły potrzeba do lokalnego odkształcenia jej ściany. Pozorna sztywność ściany powinna więc maleć wraz ze wzrostem promienia komórki. Jednak w modelu pominięto wpływ ciśnienia turgorowego na naprężenie ścian łagiewki (Bolduc i in. 2006). W komórkach w stanie turgoru wzrost promienia komórki powoduje zwiększenie naprężenia jej ściany, a związku z tym zwiększenie pozornej sztywności ściany. Oznacza to, że wraz ze wzrostem promienia komórki taka ściana trudniej się odkształca, czyli potrzeba większej siły, aby uzyskać takie samo odkształcenie ściany pod wpływem nacisku z zewnątrz. Zaś w komórkach, w których brak turgoru, ściany nie są naprężone, a wraz ze wzrostem promienia komórki o stałą grubość ściany, zmniejsza się pozorna sztywność ściany. Oznacza to, że wraz ze wzrostem promienia komórki taka ściana łatwiej się odkształca, czyli potrzeba mniejszej siły, aby uzyskać takie samo odkształcenie ściany pod wpływem nacisku z zewnątrz (Weber i in. 2015).

Wpływ ciśnienia turgorowego na pozorną sztywność ścian komórki pokazały również badania polegające na wciskaniu szklanej kulki (*ball tonometry*) w powierzchniową ścianę peryklinalną adaksjalnej epidermy łuski cebuli (Wei i in. 2001). Powierzchnia kontaktu szklanej kulki ze ścianą miała kształt koła, a im większy był jego promień, tym większe odkształcenie ściany. Eksperyment przeprowadzono dla komórek epidermy cebuli inkubowanych w różnych koncentracjach mannitolu (im wyższe stężenie mannitolu, tym mniejsze ciśnienie turgorowe w komórkach). Otrzymane wyniki wykazały, że im mniejsze jest ciśnienie turgorowe w komórce, tym większy jest promień koła wyznaczającego powierzchnię kontaktu szklanej kulki ze ścianą, a to oznacza, że taka ściana łatwiej ulega odkształceniu, czyli jej pozorna sztywność jest mniejsza. Zatem im wyższe jest ciśnienie

turgorowe w komórce, tym ściana jest bardziej naprężona, a jej pozorna sztywność jest większa (Wei i in. 2001).

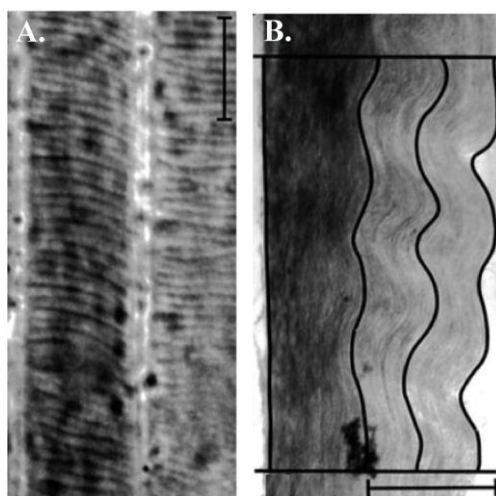
Badania z wykorzystaniem CFM wykazały natomiast, że pozorna sztywność zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek adaksjalnej epidermy cebuli nie jest jednorodna (Routier-Kierzkowska i in. 2012). W miejscach, w których ściany peryklinalne sąsiadujących komórek stykały się ze sobą nad ścianami antyklinalnymi, pozorna sztywność ścian peryklinalnych komórek w stanie turgoru była mniejsza niż w pozostałych regionach. Natomiast w komórkach o obniżonym ciśnieniu turgorowym pozorna sztywność zewnętrznej ściany peryklinalnej była większa nad ścianami antyklinalnymi niż w części centralnej. Zjawisko to wytłumaczono, wykorzystując model komórek epidermy cebuli poddanej mikroindentacji oparty na metodzie elementów skończonych (FEM - *Finite Element Method*) (Routier-Kierzkowska i in. 2012). Modelowanie wykazało, że najprawdopodobniej moduł elastyczności ściany jest mniejszy w miejscach styku ścian antyklinalnych niż w części centralnej, ale pozorna sztywność powierzchni w miejscach styku ścian w mniejszym stopniu rośnie wraz z ciśnieniem turgorowym niż w centralnej części ściany.

Pomiary w CFM przeprowadzone na epidermie działek kielicha *A. thaliana* oraz symulacje komputerowe wykazały zaś, że różnice w pozornej sztywności ścian komórkowych (w tych badaniach określanej jako sztywność komórek – *cell stiffness*) zależą w znacznym stopniu od geometrii komórek (Mosca i in. 2017). W szczególności, ściany peryklinalne w części centralnej dużych, wydłużonych komórek epidermy działek kielicha charakteryzują się większą pozorną sztywnością niż ściany mniejszych komórek znajdujących się pomiędzy nimi, mimo tej samej grubości ścian i ciśnienia turgorowego oraz jednorodności mechanicznej ścian (Mosca i in. 2017).

I.3.5. Wyboczenie warstw ściany komórkowej na skutek zniesienia naprężeń.

Zniesienie naprężenia rozciągającego ścianę komórkową oprócz zmian kształtu i rozmiaru komórki prowadzić może także do zróżnicowanego odkształcenia warstw budujących ścianę. Zjawisko to zaobserwowano w stosunkowo grubych pierwotnych ścianach powierzchniowych peryklinalnych epidermy organów o cylindrycznym kształcie. Jak omówiono we wcześniejszych rozdziałach, w ścianach żywych komórek *in situ* oprócz naprężenia wynikającego z turgoru występują często naprężenia tkankowe (Hejnowicz 1997). Dlatego w przypadku organów takich jak łodyga, koleoptyl, czy hipokotyl, naprężenie rozciągające ścianę może zostać zniesione poprzez izolację tkanki z organu, która znosi naprężenia tkankowe, i inkubację w roztworze plazmolizującym, która znosi naprężenia

wynikające z turgoru. Ze względu na naprężenia tkankowe rozkład naprężeń rozciągających w ścianach komórek tkanki zewnętrznej *in situ* jest anizotropowy, z maksymalnym naprężeniem w kierunku podłużnym i minimalnym w kierunku poprzecznym. Po całkowitym zniesieniu naprężeń (na drodze izolacji i plazmolizy) ściana peryklinalna odkształcała się silnie anizotropowo, z maksymalnym kurczeniem w kierunku podłużnym i nieznacznym w kierunku poprzecznym. Badając komórki epidermy i kolenchymy rosnących pędów kwiatostanowych mniszka lekarskiego (*Taraxacum officinale*) oraz epidermy etiolowanych hipokotyli słonecznika (*Helianthus annuus*) i etiolowanych koleoptyli jęczmienia (*Hordeum vulgare*), stwierdzono, że skutkiem takiego odkształcenia ściany było powstawanie prążków na wewnętrznej, czyli położonej od strony protoplastu, powierzchni zewnętrznej ściany peryklinalnej, które widoczne były w mikroskopie Nomarskiego (Hejnowicz, Borowska-Wykręt 2005; Lipowczan i in. 2018). Prążki zorientowane były poprzecznie względem długiej osi komórki (Ryc.I.3.3.A). Obserwacje w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM) przekrojów podłużnych radialnych przez taką ścianę wykazały zaś, że prążki widoczne w mikroskopie Nomarskiego (Ryc.I.3.3.A) są efektem pofalowania wewnętrznej powierzchni ściany (Ryc.I.3.3.B).



Ryc.I.3.3. Prążki widoczne w mikroskopii Nomarskiego (**A**) oraz pofalowanie wewnętrznej warstwy ściany na przekroju podłużnym promieniowym przez zewnętrzną ścianę peryklinalną komórek epidermy hipokotyli słonecznika widoczne w mikroskopie elektronowym (**B**) (Hejnowicz, Borowska-Wykręt 2005). Skala odpowiednio 10 μ m - **A** oraz 1 μ m - **B**.

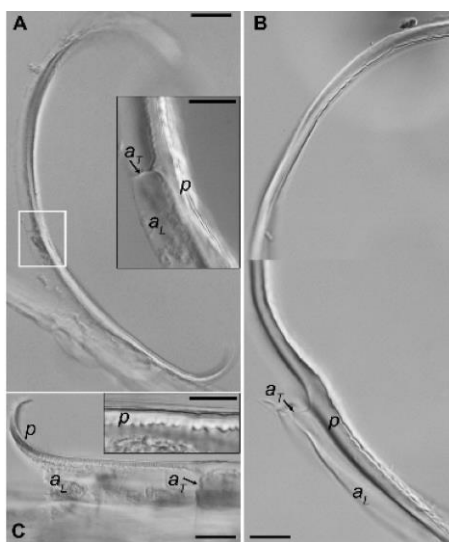
W komórkach epidermy apikalnej części hipokotyli słonecznika sama izolacja tkanki nie wystarczała do pojawienia się prążków. Pojawiały się one dopiero w komórkach, które po izolacji poddano plazmolizie. Jednocześnie deplazmolizie takich komórek towarzyszył zanik

prążków. Oznacza to, że zniesienie samych tylko naprężeń tkankowych w ścianie nie jest wystarczające, aby doszło do powstania na wewnętrznej powierzchni ściany zafalowań na tyle wyraźnych, by były widoczne w mikroskopie Nomarskiego. Prążków nie zaobserwowano również w plazmolizowanych komórkach, które izolowano z bazalnej części dojrzałego hipokotyła. Komórki w tej części hipokotyła nie są już zdolne do wydłużania, co sugeruje, że powstawanie prążków powiązane jest ze zdolnością komórek do wydłużania, co jak wiadomo ściśle zależy od właściwości ściany (Hejnowicz, Borowska-Wykręt 2005).

Powstawanie prążków tłumaczyć można wyboczeniem wewnętrznych warstw ściany (Hejnowicz, Borowska-Wykręt 2005; Lipowczan i in. 2018). Wyboczenie to ugięcie (pofalowanie) ciała stałego na skutek ściskania w kierunku równoległym do długiej osi ciała. Warunkiem wyboczenia jest więc pojawienie się sił ściskających w płaszczyźnie ściany. Wynikają one z gradientu odkształcenia elastycznego poszczególnych warstw ściany *in situ*. Gradient odkształcenia elastycznego zorientowany jest w poprzek ściany, przy czym odkształcenie rośnie w kierunku na zewnątrz komórki. Występowanie gradientu zostało potwierdzone przez eksperyment, w którym obserwowano wyginanie się ścian peryklinalnych zewnętrznych izolowanych z komórek epidermy hipokotyła słonecznika, umieszczonej jeszcze przed izolacją ścian odpowiednio w roztworze hipotonicznym, hipertonicznym oraz izotonicznym (Ryc.I.3.4). Na zmianę osmoticum nie może bowiem reagować wyizolowana ściana, lecz tylko nienaruszona tkanka. W związku z tym, że we wszystkich trzech roztworach po izolacji obserwowano wyginanie się ścian peryklinalnych zewnętrznych, w kierunku na zewnątrz od powierzchni hipokotyła (Ryc.I.3.4), można stwierdzić, że w ścianach tych przed izolacją występuje gradient odkształcenia elastycznego (Hejnowicz, Borowska-Wykręt 2005; Lipowczan i in. 2018). W związku z tym, *in situ* wszystkie warstwy ściany mają taką samą długość, jednak najstarsza, czyli zewnętrzna warstwa ściany jest rozciągnięta w kierunku podłużnym, a wewnętrzna (najmłodsza) warstwa nie. Dlatego po zniesieniu naprężenia ściany warstwa zewnętrzna kurczy się zdecydowanie bardziej od warstwy wewnętrznej, co powoduje, że na warstwę wewnętrzną ściany wywierana jest siła ściskająca, powodując jej wyboczenie (Hejnowicz, Borowska-Wykręt 2005; Lipowczan i in. 2018).

Występowanie gradientu odkształcenia elastycznego w poprzek warstw ściany wyjaśnia prosty model, w którym założono, że ściana składa się z trzech pokładów, zawierających wiele warstw, zatopionych w elastycznym medium. Po zniesieniu naprężenia ściany, zlokalizowany najbliżej protoplastu pokład pierwszy tworzy pofalowanie charakteryzujące się dużą amplitudą. Zlokalizowany głębiej pokład drugi tworzy pofalowanie

z mniejszą amplitudą, a pokład trzeci jest niepofalowany. Takie zachowanie poszczególnych pokładów ściany jest efektem gradientu odkształcenia elastycznego występującego w poprzek ściany. Po zniesieniu naprężenia rozciągającego pokład trzeci ściany intensywnie kurczy się, jednocześnie generując naprężenia ściskające w płaszczyźnie pokładu drugiego i pierwszego, które w mniejszym stopniu się kurczą i w efekcie ulegają wyboczeniu (Lipowczan i in. 2018). Aby w poprzek ściany *in situ* występował gradient odkształcenia elastycznego, w ścianie musi występować zorientowany w poprzek ściany gradient naprężenia rozciągającego, które rośnie w kierunku na zewnątrz komórki, i/lub gradient modułu elastyczności, który rośnie w kierunku do wewnątrz komórki (Lipowczan i in. 2018).



Ryc.I.3.4. Wyginanie się izolowanych fragmentów zewnętrznej ściany peryklinalnej (p) komórek epidermy hipokotyła słonecznika, które jeszcze przed izolacją umieszczono odpowiednio w roztworze izotonicznym (A), hipotonicznym (B) oraz hipertonicznym (C) (Lipowczan i in. 2018).

We wszystkich roztworach izolowane fragmenty ściany wyginają się w kierunku na zewnątrz od powierzchni hipokotyła. Zaś fragmenty ściany, które pozostały połączone ze ścianą antyklinalną poprzeczną (a_T) oraz podłużną (a_L) nie ulegają wyginaniu (powiększone obrazy na A i C), a ponieważ izolacja epidermy znosi naprężenia tkankowe, warstwy wewnętrzne tych ścian są pofalowane.

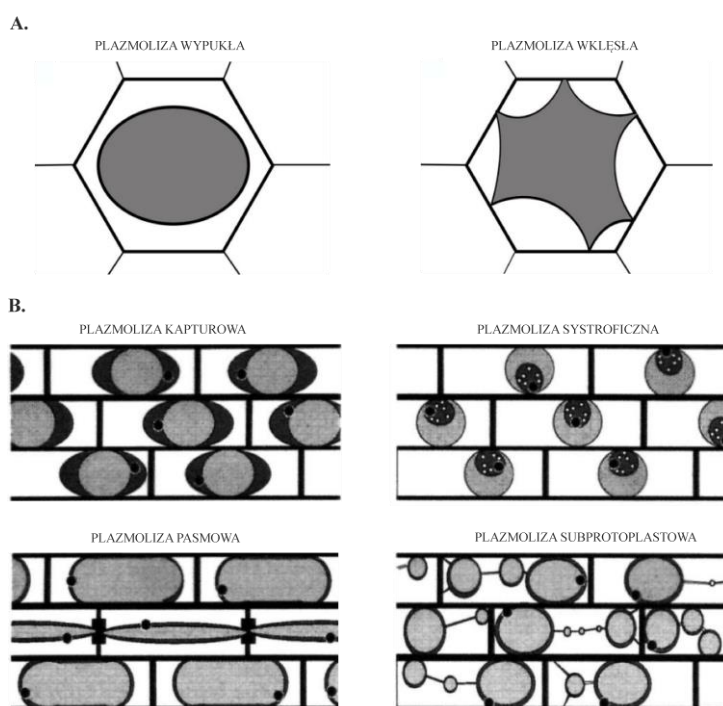
Skala odpowiednio 20 μm – A, C oraz 10 μm – B, powiększone obrazy na A, C.

I.4. Plazmoliza oraz deplazmoliza jako skutki traktowania osmotycznego.

Terminu „plazmoliza” jako pierwszy użył w 1877 roku De Vries (wg Oparka 1994), który zdefiniował ją jako odseparowanie żywego protoplastu od ściany komórkowej, spowodowane umieszczeniem komórki w roztworze hipertonicznym. W takim roztworze zmniejsza się bowiem turgor, czego skutkiem jest kurczenie i gwałtowne oderwanie protoplastu od ściany. Plazmoliza jest procesem charakterystycznym dla żywych komórek,

odwracalnym w procesie deplazmolizy (Lang i in. 2014). Oznacza to, że po umieszczeniu w roztworze hipotonicznym (np. w wodzie) komórka pobiera wodę, przez co zwiększa się jej turgor i objętość protoplastu, który zaczyna ponownie przylegać do ściany.

Wyróżnia się dwa główne rodzaje plazmolizy: wypukłą oraz wklęsłą (Ryc.I.4.1.A). Plazmoliza wypukła charakteryzuje się tym, że cały protoplast oraz wszystkie jego końce są zaokrąglone i wypukłe. Zachodzi ona w komórkach, które mają stosunkowo małą lepkość cytoplazmy oraz słabe połączenia pomiędzy błoną a ścianą komórkową. Natomiast podczas plazmolizy wklęsłej protoplast odrywa się od ściany w taki sposób, że błona komórkowa tworzy wklęsłe kieszenie. Ten typ plazmolizy zachodzi w komórkach, które mają stosunkowo dużą lepkość cytoplazmy oraz mocne połączenia pomiędzy błoną a ścianą (Lee-Stadelmann i in. 1984; Oparka 1994; Lang i in. 2014).



Ryc.I.4.1. Dwa główne rodzaje plazmolizy (A) (Lang i in.2014) oraz szczególne jej przypadki (B) (Oparka 1994).

Istnieje również szereg szczególnych przypadków plazmolizy, takich jak (Ryc.I.4.1.B):

- plazmoliza kapturowa – zachodzi podczas wydłużonej inkubacji komórek w solach alkalicznych (zwłaszcza solach potasu), które powodują pęcznienie cytoplazmy i jej odkładanie na dwóch końcach cylindrycznego protoplastu w postaci tzw. kapturków (Küster 1929 wg Oparka 1994);

- plazmoliza systroficzna – cytoplazma tworzy kulę najczęściej zlokalizowaną wokół jądra (Oparka 1994);
- plazmoliza pasmowa – występuje w komórkach, w których błona jest bardzo silnie połączona ze ścianą, a podczas plazmolizy odsuwa się od ściany, pozostawiając pasmo cytoplazmy wzdłuż centralnej części komórki (Oparka 1994);
- plazmoliza subprotoplastowa – zachodzi, gdy komórka potraktowana jest roztworem o zbyt dużym stężeniu, co powoduje fragmentację protoplastu na mniejsze sub-protoplasty, które połączone są ze sobą i/lub ze ścianą (Oparka 1994).

Omawiając zjawisko plazmolizy należy również wspomnieć o cytoryzie, która zachodzi, gdy cząsteczki roztworu hipertonicznego są większe niż pory w ścianie. To prowadzi do kurczenia komórki wraz ze ścianą, na zasadzie zapadania się ściany, w przeciwieństwie do klasycznej plazmolizy, gdzie protoplast ulega większemu kurczeniu niż ściana (Oparka 1994).

I.4.1. Połączenia błony komórkowej ze ścianą w komórkach plazmolizowanych.

Pierwszym dostrzegalnym przejawem plazmolizy jest stopniowe odsuwanie się błony komórkowej od ściany. Jednak w wybranych miejscach błona i ściana pozostają ze sobą połączone za pomocą tzw. siateczki Hechta, która wraz z początkiem plazmolizy zaczyna się tworzyć w przestrzeni pomiędzy ścianą a kurczącym się protoplastem, a swoją strukturą przypomina siateczkę śródplazmatyczną. Następnie z siateczki Hechta wyodrębniają się nici Hechta, które są utworzone głównie z błony komórkowej i pełnią funkcję łącznika protoplastu ze ścianą. Czasami naprężenie nici Hechta jest tak duże, że prowadzi do deformacji błony komórkowej otaczającej protoplast. Podczas depłazmolizy, zwiększający swoją objętość protoplast ulega fuzji z niemi Hechta (Lang-Pauluzzi 2000). Badania przeprowadzone na komórkach epidermy cebuli wykazały, że nici Hechta nie powstają, tak jak początkowo sądzono, wyłącznie w miejscach, gdzie występują plazmodesmy (Strasburger i in. 1983 wg Pont-Lezica i in. 1993; Pont-Lezica i in. 1993). Raczej pomiędzy ścianą i błoną komórkową istnieją miejsca łącznikowe, które znakuje przeciwciało łączące się z HRGP (glikoproteina bogata w hydroksyprolinę). Punktowe rozmieszczenie takich miejsc łącznikowych stwierdzono zarówno w ścianie komórkowej, jak i w błonie protoplastów po enzymatycznej hydrolizie ściany. Są one najprawdopodobniej związane z wytwarzaniem nici Hechta (Pont-Lezica i in. 1993).

Badania przeprowadzone na plazmolizowanych komórkach epidermy liścia trzykrotki wirginijskiej (*Tradescantia virginiana*) wykazały, że w komórkach tych występują włókna

rozciągające się od błony do ściany, które zanikały po traktowaniu celulazą. Traktowanie celulazą skutkowało również tym, że część siateczki oraz nici Hechta ulegała rozpadowi na małe pęcherzyki, które zlokalizowane były w pobliżu ściany i czasami połączone ze sobą. Wyniki te sugerują, że przez nici Hechta biegną MF, które są zakotwiczone w elementach matriksu ściany komórkowej, dzięki czemu są „kotwicami” dla błony komórkowej podczas jej odsuwania się od ściany w trakcie plazmolizy (Lang i in. 2004). Inne składniki ściany, takie jak kaloza i pektyny, nie występują ani w niciach i siateczce Hechta, ani w błonie protoplastu, co oznacza, że nie są bezpośrednio zaangażowane w tworzenie połączenia błona - ściana w komórkach plazmolizowanych. Wokół siateczki i nici Hechta występuje natomiast kaloza, która może być stabilizowana przez pektyny (Lang i in. 2004).

I.4.2. Reorganizacja błony komórkowej.

Gdy podczas plazmolizy protoplast zmniejsza swój rozmiar, z fragmentów otaczającej go błony, której powierzchnia jest zbyt duża w stosunku do powierzchni kurczącego się protoplastu, wytwarzane są pęcherzyki na drodze procesu endocytozy, dla której stosowano również nazwę „osmocytoza” (Diekmann i in. 1993). Plazmoliza komórek epidermy cebuli w obecności barwnika LYCH (*Lucifer Yellow CH*), dla którego błona jest nieprzepuszczalna, skutkowała powstawaniem z błony komórkowej pęcherzyków zawierających ten barwnik, które początkowo przylegały do błony. Zaobserwowano, że podczas deplazmolizy pęcherzyki te zaczynały poruszać się w cytoplazmie, a czasami skupiały się w pobliżu otoczki jądrowej, ale nie ulegały fuzji z błoną komórkową ani błonami poszczególnych organelli. Kolejna plazmoliza tych samych komórek przeprowadzona w obecności innego, również nieprzepuszczanego przez błonę barwnika *Cascade Blue* powodowała powstawanie nowej puli pęcherzyków zawierających ten barwnik. Tak więc po drugiej plazmolizie w cytoplazmie komórek obecne były dwie pule pęcherzyków zawierających różne barwniki (Oparka i in. 1990). Ponieważ pęcherzyki te powstają z fragmentów błony otaczającej kurczący się podczas plazmolizy protoplast i pozostają w komórce po deplazmolizie, stwierdzono, że fragmenty błony komórkowej, które podczas plazmolizy na drodze endocytozy dostają się do protoplastu, nie są wykorzystywane do odbudowy błony podczas deplazmolizy (Oparka 1994).

I.4.3. Zaburzenie łączności symplazmowej.

Jak już wcześniej wspomniano, plazmodesmy nie są zaangażowane w powstawanie nici Hechta. Jednak plazmoliza powoduje zaburzenia łączności symplazmowej między

komórkami, za którą odpowiadają plasmodesmy. Badania polegające na podawaniu barwników fluorescencyjnych (6-karboksyfluoresceina oraz fluoresceinowy kwas glutaminowy), które w normalnych warunkach (przed plazmolizą) swobodnie przemieszczają się symplazmowo, do komórek liścia moczarki (*Egeria densa*) wykazały, że jeśli barwnik fluorescencyjny został podany przed plazmolizą, to jego fluorescencję po plazmolizie obserwowano wyłącznie w protoplastach, a w przestrzeni komórkowej między błoną a ścianą nie stwierdzono fluorescencji. Natomiast gdy barwnik podano do pojedynczej komórki z próbki po plazmolizie, to jego fluorescencję obserwowano wyłącznie w tej komórce, do której go podano. Gdy taką próbkę poddano deplazmolizie, obserwowano powolne rozprzestrzenianie się barwnika do coraz większej liczby sąsiadujących komórek, co świadczy o odtworzeniu ciągłości symplazmowej między nimi (Erwee, Goodwin 1984). Plazmoliza powoduje więc zaburzenia łączności symplazmowej, jednak jest to proces odwracalny, co sugeruje, że plasmodesmy nie ulegają zniszczeniu podczas plazmolizy.

I.4.4. Organizacja elementów cytoszkieletu podczas plazmolizy.

Elementy cytoszkieletu, takie jak MT oraz filamenty aktynowe (AF), mają zdolność dopasowywania się do zmieniających się rozmiaru i kształtu protoplastu w trakcie cyklu plazmoliza - deplazmoliza. Taką reorganizację elementów cytoszkieletu badano na żywych komórkach hipokotyli linii transgenicznych *A. thaliana*, w których elementy cytoszkieletu znakowane były GFP (*Green Fluorescent Protein*). W komórkach epidermy hipokotyli przed plazmolizą MT ułożone były równolegle względem siebie i skośnie lub poprzecznie względem długiej osi komórki. W trakcie plazmolizy, aby dopasować się do zmniejszającego się rozmiaru protoplastu, MT ulegały pofalowaniu i łączyły się w wiązki. Zaś podczas deplazmolizy układ MT w bardzo powolny sposób reorganizował się do stanu sprzed plazmolizy (Lang i in. 2014). W przeciwieństwie do układu MT układ AF w trakcie plazmolizy oraz deplazmolizy pozostawał praktycznie taki sam jak w komórkach przed plazmolizą. Zachowanie układu AF podczas cyklu plazmoliza - deplazmoliza jest możliwe dzięki obecności globularnych cząsteczek aktyny w cytoplazmie, które umożliwiają bardzo szybką reorganizację AF, czyli montażu lub demontażu w zależności od potrzeb (Lang i in. 2014). Lang wraz ze współpracownikami (2014) stwierdzili również obecność MT oraz AF w niciach Hechta. Jednak dalsze badania wykazały, że wytwarzanie nici Hechta nie jest zależne od elementów cytoszkieletu (Lang-Pauluzzi 2000).

II. Cel pracy.

Adakksjalna epiderma łuski cebuli (*Allium cepa*), która jest obiektem badań przedstawionych w niniejszej pracy, charakteryzuje się prostą budową oraz tym, że jest słabo przyczepiona do leżącego pod nią miękiszu. Dlatego izolacja tej epidermy bez uszkodzenia jej komórek jest łatwa, a w tkance brak naprężeń tkankowych. W związku z tym plazmoliza oraz deplazmoliza komórek epidermy powodują odpowiednio całkowite zniesienie lub odtworzenie naprężeń rozciągających w ścianie. Zmiany naprężeń w ścianie prowadzą zaś do jej odkształcenia. Adakksjalna epiderma łuski cebuli wydaje się więc być bardzo dobrym obiektem do badań zależności odkształcenia towarzyszącego plazmolizie oraz deplazmolizie od właściwości mechanicznych ścian komórkowych oraz geometrii komórek. Dlatego **celem niniejszej pracy było określenie, jakie odkształcenia towarzyszą plazmolizie oraz deplazmolizie komórek adakksjalnej epidermy łuski cebuli oraz poszukiwanie czynników, od których zależy wielkość i anizotropia tych odkształceń.**

Badania zaplanowano tak, by zweryfikować następujące hipotezy robocze:

Hipoteza 1: Plazmolizie oraz deplazmolizie komórek adakksjalnej epidermy łuski cebuli towarzyszy odpowiednio zmniejszenie oraz zwiększenie objętości komórki oraz powierzchni zewnętrznej ściany peryklinalnej.

Hipoteza 2: Wielkość odkształcenia objętościowego oraz powierzchniowego towarzyszącego plazmolizie oraz deplazmolizie zależy od: stopnia dojrzałości cebuli, z której pochodzą badane komórki epidermy; wielkości zmiany ciśnienia osmotycznego; kształtu i rozmiarów komórek.

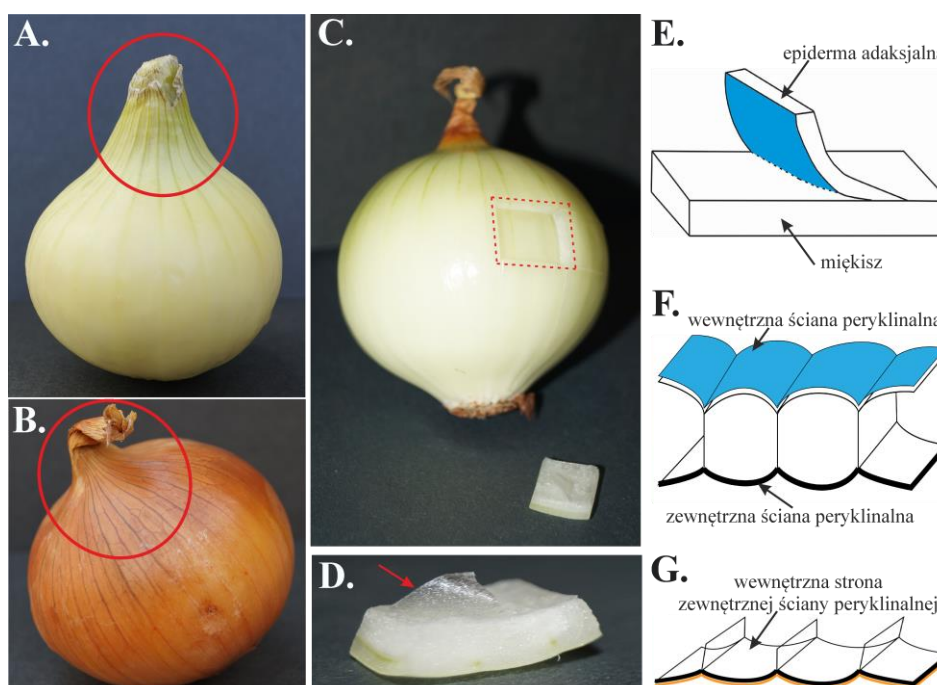
Hipoteza 3: Odkształcenie komórek martwych towarzyszące traktowaniu osmotycznemu epidermy zależy od odkształcenia komórek sąsiednich.

Hipoteza 4: Anizotropia towarzyszącego plazmolizie odkształcenia powierzchniowego zewnętrznej ściany peryklinalnej komórki epidermy cebuli zależy od geometrii komórki, anizotropii naprężenia w ścianie komórki w stanie turgoru oraz anizotropowych właściwości mechanicznych ściany.

III. Materiał i metody.

III.1. Materiał roślinny.

Badano cebule *Allium cepa* (cebula zwyczajna) z bieżącego sezonu uprawowego, pochodzące od lokalnego dostawcy, których średnica wynosiła około 5-7cm. Wykorzystywano cebule młode, zbierane w okresie wczesnego i pełnego lata, które nie posiadały jeszcze suchych łusek zewnętrznych a ich szczypior nie był „załamany” (Ryc.III.1.1.A niezałamany szczypior zaznaczono czerwoną elipsą), oraz cebule dojrzałe, zbierane w okresie późnego lata i wczesnej jesieni, które posiadały już suche łuski zewnętrzne i „załamany” szczypior (Ryc.III.1.1.B zaznaczony czerwoną elipsą) (Dobrakowska-Kopecka 1996).



Ryc.III.1.1. Materiał wykorzystywany w eksperymentach: **A** - młoda cebula z tzw. niezałamanym szczypiorem (czerwona elipsa), nie posiadająca suchych łusek zewnętrznych; **B** - dojrzała cebula z tzw. „załamanym” szczypiorem (czerwona elipsa) i suchymi łuskami zewnętrznymi; **C** - cebula dojrzała, z której usunięto suche łuski zewnętrzne i wycięto fragment żywej łuski w części okołorównikowej; **D** - fragment łuski z częściowo odizolowaną epidermą adaksjalną (czerwona strzałka); **E** - schemat przedstawiający fragment łuski z częściowo wyizolowaną epidermą adaksjalną oraz leżącym pod nią mięksiszem (na niebiesko zaznaczono powierzchnię wewnętrznych ścian peryklinalnych komórek epidermy); **F** - fragment izolowanej epidermy adaksjalnej z zaznaczonymi ścianami peryklinalnymi zewnętrznymi (czarne) i wewnętrznymi (niebieskie); **G** - fragment izolowanych zewnętrznych ścian peryklinalnych. Powierzchnią zewnętrzną ściany przyklejone są do szkiełka a ich powierzchnia wewnętrzna (powierzchnia ściany od strony protoplastu) jest odsłonięta.

Badania prowadzono na adaksjalnej epidermie łuski (wskazana strzałką na Ryc.III.1.1.D), którą izolowano z okółorównikowej części cebuli (przykładowe miejsce, z którego wyizolowano fragment łuski, zaznaczono na czerwono na Ryc.III.1.1.C). Do eksperymentów wybierano wyłącznie żywe łuski. W przypadku cebul młodych, nie posiadających jeszcze suchych łusek zewnętrznych, narażoną na uszkodzenia i wysychanie pierwszą zewnętrzną łuskę usuwano, a do eksperymentów wybierano drugą lub kolejne 3-5 łusek. Natomiast w przypadku cebul dojrzałych usuwano wszystkie suche łuski zewnętrzne, a do eksperymentów wybierano pierwszą żywą lub kolejne 2-5 łusek. Do badań ściany komórkowej wykorzystywano wyłącznie zewnętrzną ścianę peryklinalną epidermy adaksjalnej łusek (Ryc.III.1.1.F-G).

III.2. Metody badania układów fibryl celulozowych w ścianie komórkowej oraz prążków na wewnętrznej powierzchni ściany.

III.2.1. Badania układu fibryl celulozowych na wewnętrznej powierzchni ściany peryklinalnej przy użyciu mikroskopu sił atomowych.

Układ fibryl celulozowych badano wykorzystując mikroskop sił atomowych (*Atomic Force Microscopy* - AFM) JPK Nanowizard III, połączony z odwróconym mikroskopem świetlnym Zeiss Axio Observer. Pomiary wykonywano na preparatach z odsłoniętą wewnętrzną powierzchnią zewnętrznych ścian peryklinalnych (Ryc.III.1.1.G) komórek epidermy pochodzącej z cebul dojrzałych (sposób przygotowania preparatów opisano szczegółowo w Aneksie; An.1). Badano izolowane ściany peryklinalne uzyskane z epidermy plazmolizowanej przed rozerwaniem, które nie były traktowane chemicznie po izolacji, oraz ściany izolowane z epidermy nieplazmolizowanej przed rozerwaniem, które były po izolacji traktowane chemicznie. Plazmolizę przeprowadzano inkubując wycięte fragmenty łuski wraz z epidermą w 5% NaCl (chlorek sodu). Miała ona na celu silne obkurczenie protoplastu a tym samym odsłonięcie wewnętrznej powierzchni ściany peryklinalnej. W przypadku próbek nieplazmolizowanych, w celu usunięcia elementów matriks, resztek protoplastu i lepszego odsłonięcia wewnętrznej powierzchni ściany, próbki traktowano w płuczce ultradźwiękowej ACE (wybielacz zawierający 4,5% NaClO - podchloryn sodu) i/lub 5% NaOH (wodorotlenek sodu) (Broda 1971). Cztery procedury przygotowania materiału przedstawiono w Tabeli III.2.1.

PROCEDURA	PLAZMOLIZA (5% NaCl)	ACE	5% NaOH
I	-	✓ (15-60min)	-
II	-	-	✓ (15min)
III	-	✓ (10min)	✓ (10min)
IV	✓ (10-60min)	-	-

Tabela III.2.1. Cztery procedury (I-IV) przygotowania próbek wykorzystywanych do badania ułożenia fibryl celulozowych przy pomocy AFM. W procedurach I-III próbki nie były plazmolizowane przed rozrywaniem, ale traktowane chemicznie po rozerwaniu. W procedurze IV próbki plazmolizowano.

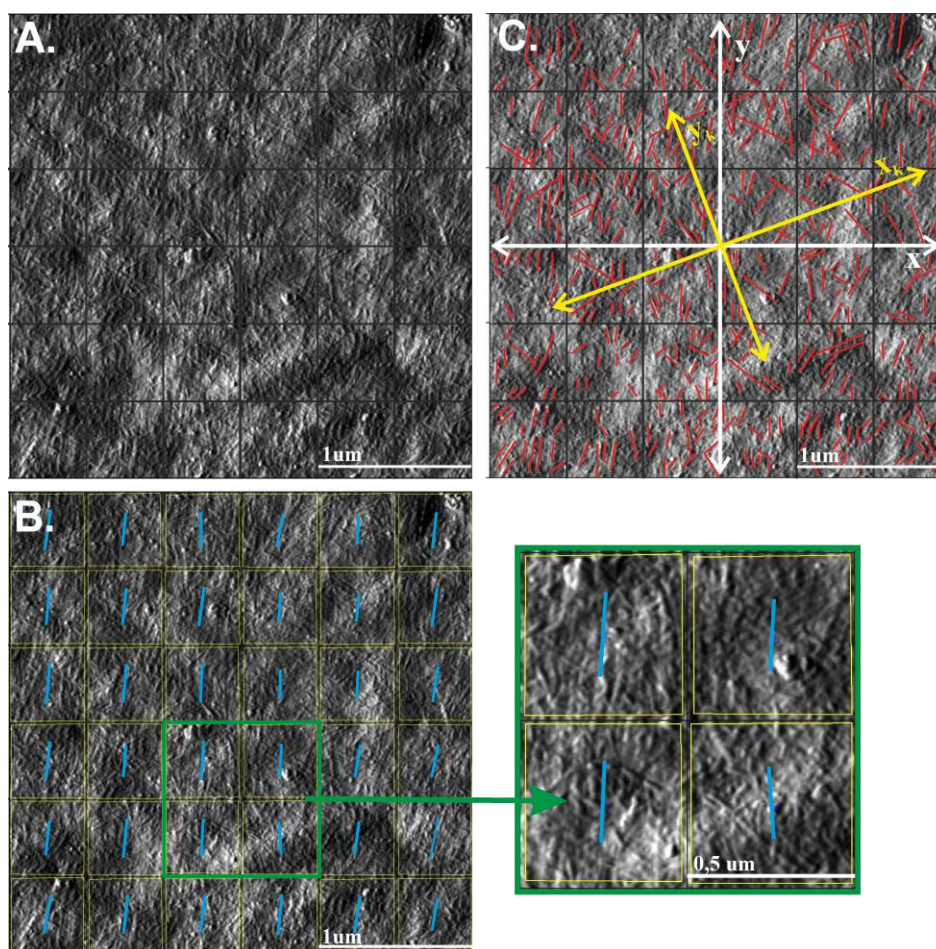
Szkiełka podstawowe, z przyklejonymi do powierzchni izolowanymi ścianami peryklinalnymi komórek epidermy, płukano w wodzie dejonizowanej w płuczce ultradźwiękowej i suszono używając suszarki do włosów. Następnie szkiełka z wysuszonymi próbkami umieszczano w komorze AFM i obrazowano układ fibryl dla wybranych fragmentów ścian. Do badań wybierano fragmenty ścian, które znajdowały się w części równowąskiej komórek. Ponieważ ramię sondy AFM opiera się na pozostałych po rozrywaniu komórek resztkach ścian antyklinalnych, nie było możliwe badanie układu fibryl celulozowych na fragmentach ścian peryklinalnych zlokalizowanych na końcach komórek. Obserwacje prowadzono na sucho, w trybie kontaktowym, wykorzystując igłę trójkątną lub prostokątną.

Układ fibryl celulozowych analizowano na obrazach typu *Vertical Deflection Images*, o rozmiarze 2µm x 2µm (próbki przygotowane według procedury I) lub 3µm x 3µm (procedury II-IV), które dzielono odpowiednio na 16 lub 36 kwadratów o boku 0,5µm w programie CorelDraw (Ryc.III.2.1.A). Dla każdego z tych kwadratów analizowano układ fibryl na dwa sposoby: (i) wykorzystując narzędzie ImageJ FibrilTool (Ryc.III.2.1.B) (Boudaoud i in. 2014); (ii) metodą ręcznej digitalizacji z wykorzystaniem CorelDraw oraz ImageJ (Ryc.III.2.1.C).

Za pomocą narzędzia ImageJ FibrilTool (Boudaoud i in. 2014) wyznaczano anizotropię oraz dominującą orientację fibryl na zadanym obszarze, osobno dla każdego z 16 lub 36 kwadratów wyznaczonych na obrazie (Ryc.III.2.1.B). Ponieważ obliczony przez FibrilTool kąt jest kątem nachylenia fibryl względem osi x obrazu (biała oś x na Ryc.III.2.1.C), otrzymane wyniki przeliczano tak, aby wyznaczyć kąt nachylenia fibryl

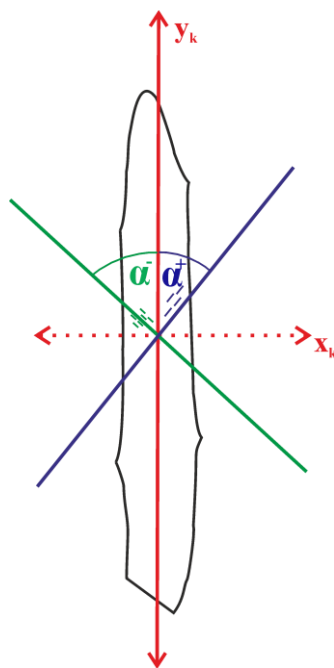
względem długiej osi komórki (żółta oś y_k na Ryc.III.2.1.C; sposób przeliczenia opisano w Aneksie; An.2).

W przypadku metody ręcznej digitalizacji, dla każdego obrazu wyznaczano długą oś komórki (y_k), następnie w programie CorelDraw digitalizowano wszystkie wyraźnie widoczne na powierzchni ściany fibryle (czerwone odcinki na Ryc.III.2.1.C) i mierzono kąt pomiędzy każdą fibrylą a y_k wykorzystując ImageJ. Następnie dla każdego kwadratu wyznaczonego na obrazie obliczano średni kąt nachylenia fibryl, korzystając ze wzoru na średnią dla danych kierunkowych (Berens 2009).



Ryc.III.2.1. Przykładowy obraz AFM (*Vertical Deflection Image*) układu fibryl celulozowych na wewnętrznej powierzchni ściany peryklinalnej, uzyskany dla fragmentu ściany z próbki przygotowanej według procedury III. **A** - obraz podzielony na 36 jednakowych kwadratów, **B** - wynik analizy anizotropii układu fibryl dla każdego kwadratu z wykorzystaniem narzędzia ImageJ FibrilTool, niebieskie odcinki wskazują na dominującą orientację fibryl a ich długość jest tym większa, im większe jest uporządkowanie fibryl, czyli anizotropia układu, **C** - fibryle wyznaczone metodą ręcznej digitalizacji (czerwone odcinki), białe osie układu współrzędnych to oś x oraz y obrazu, natomiast osie żółte wyznaczają długą oś komórki (y_k) oraz oś do niej prostopadłą (x_k).

Przyjęto, że kąt nachylenia fibryl (α) ma wartość ujemną (α^-) na lewo od osi y_k , a na prawo – dodatnią (α^+), a wartości te mieszczą się w przedziale od -90° do 90° (Ryc.III.2.2.), zgodnie z konwencją stosowaną dla kąta nachylenia fibryl mierzonego w mikroskopie polaryzacyjnym (MFA).



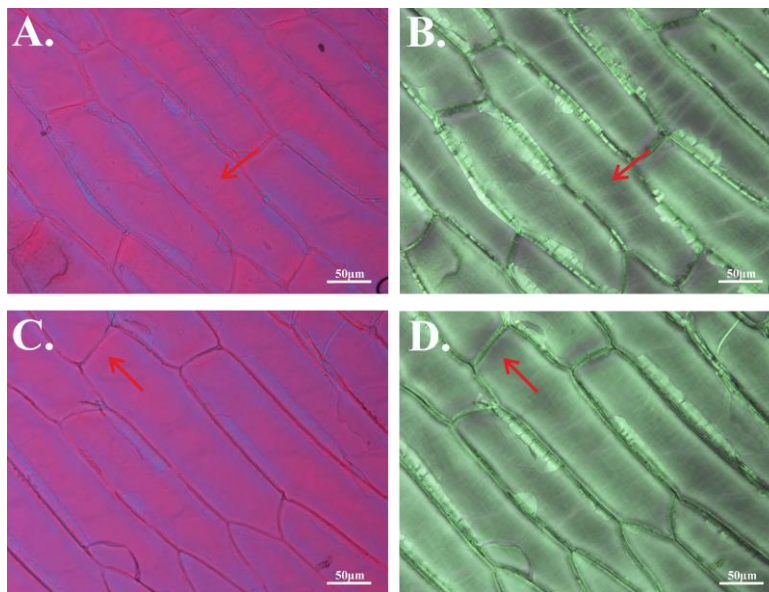
Ryc.III.2.2. Przykładowa komórka epidermy cebuli z wyznaczoną długą osią komórki (y_k) oraz osią do niej prostopadłą (x_k). Na schemacie przedstawiono dwie przykładowe grupy fibryl nachylonych w różnych kierunkach (zaznaczone na zielono oraz niebiesko). Kąt pomiędzy y_k a fibrylami zaznaczonymi na zielono przyjmuje wartości ujemne (α^-), a dla fibryl niebieskich – dodatnie (α^+).

III.2.2. Układ fibryl celulozowych w ścianie peryklinalnej mierzony przy użyciu mikroskopu polaryzacyjnego.

Wykorzystując mikroskop polaryzacyjny Nikon Eclipse 50i Pol mierzono MFA, czyli kąt nachylenia fibryl celulozowych w zewnętrznej ścianie peryklinalnej komórek epidermy względem długiej osi komórki (y_k). Aby pomiar MFA wykonany przy użyciu mikroskopu polaryzacyjnego był wiarygodny, musi być wykonany dla pojedynczej ściany komórkowej (Leney, 1981). Dlatego do badań wykorzystywano preparaty z wyizolowanymi zewnętrznymi ścianami peryklinalnymi. Preparaty były zorientowane tak jak do badań w AFM (tj. powierzchnia zewnętrzna ściany przyklejona była do szkiełka mikroskopowego, a powierzchnia wewnętrzna była odsłonięta; Ryc.III.1.1.G). Próbkę przygotowano zgodnie z procedurą IV opisaną w rozdziale III.2.1., modyfikując jedynie stężenie roztworu plazmolizującego na 2,5% NaCl oraz czas plazmolizy na 10min. Pomiar MFA wykonywano

dla różnych regionów ściany tych samych komórek (część równowąska komórek oraz końce), pod powiększeniem obiektywu 40x, wykorzystując metodę opisaną przez Leney'a dla komórek drewna wtórnego (Leney 1981; Borowska-Wykręt i in. 2017). Dokumentację fotograficzną sporządzano wykorzystując kamerę Nikon DS-Fi2 połączoną z mikroskopem polaryzacyjnym oraz oprogramowanie NIS-Elements Br.

W celu wyznaczenia MFA najpierw przy wsuniętej płytce lambda (wprowadzonej w bieg światła falowce) obracano preparat w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara do momentu, aż kolor badanego fragmentu ściany zmieniał się w kolejności żółty - purpurowy - niebieski. Po ustawieniu wybranego regionu ściany w pozycji z kolorem purpurowym (Ryc.III.2.3.A i C) wysuwano płytkę lambda (Ryc.III.2.3.B i D) i wykorzystując jedynie skrzyżowany polaryzator i analizator precyzyjnie ustalano pozycję, w której wybrany region ściany był najsilniej zaciemniony. Dla tej pozycji, nazywanej pozycją maksymalnego wygaszenia (*Maximum Extinction Position* – MEP), odczytywano kąt α_{MEP} (Leney 1981; Borowska-Wykręt i in. 2017). Następnie ponownie wsuwano płytkę lambda i preparat obracano tak, by długa oś badanej komórki była ustawiona w pozycji pionowej (równolegle do wertykalnego ramienia krzyża w okularze) i odczytywano kąt α_{pion} (Leney 1981; Borowska-Wykręt i in. 2017).



Ryc.III.2.3. Przykładowe mikrofotografie zewnętrznych ścian peryklinalnych komórek epidermy cebuli wykonane przy użyciu mikroskopu polaryzacyjnego. Widok ścian od strony protoplastu. Pary fotografii **A i B** oraz **C i D** przedstawiają te same fragmenty próbki. Czerwone strzałki wskazują badany region ściany, przy wsuniętej płytce lambda, w pozycji, w której przyjmuje on kolor purpurowy (**A, C**) oraz przy wysuniętej płytce lambda jeszcze przed precyzyjnym ustawieniem zaciemnienia (**B, D**).

Wartość MFA obliczano ze wzoru:

$$(1) \quad \text{MFA} = \alpha_{\text{MEP}} - \alpha_{\text{pion}}$$

Dla każdego badanego regionu ściany wykonywano dwa pomiary MFA, a z otrzymanych wyników obliczano średnią. Przyjęto, że jeśli fibryle skierowane są na prawo od długiej osi komórki (y_k), to MFA jest dodatnie, natomiast na lewo – ujemne, a wartość kąta mieści się w przedziale od -90° do 90° .

III.2.3. Układ prążków na wewnętrznej powierzchni ściany widocznych w mikroskopii Nomarskiego.

Wyizolowane skrawki epidermy o wymiarach około 0,5cm x 0,5cm umieszczano na szkiełku podstawowym w kropli roztworu plazmolizującego (2,5% NaCl) i pozostawiano na 10 min. Po tym czasie preparaty przykrywano szkiełkiem nakrywkowym i obserwowano w mikroskopie świetlnym Nikon Eclipse 80i w celu upewnienia się, że zaszła plazmoliza. Następnie, wykorzystując mikroskop Nomarskiego obserwowano preparat poszukując obszarów, w których widoczne były prążki będące efektem wyboczenia najmłodszej warstwy zewnętrznej ściany peryklinalnej (Lipowczan i in. 2018). Obszary składające się z kilkunastu lub kilkudziesięciu komórek, z prążkami widocznymi w różnych częściach ściany, fotografowano pod powiększeniem obiektywu 40x, wykorzystując kamerę Nikon DS-Fi2 oraz oprogramowanie NIS-Elements BR 4.10.00 64-bit, które umożliwia tworzenie map składających się z dużej liczby pojedynczych zdjęć. Dla tak otrzymanych map, wykorzystując oprogramowanie CorelDraw, sporządzano schematy przedstawiające zarys kształtu komórek oraz układ prążków w poszczególnych komórkach. W każdej komórce wyznaczano jej długą oś (y_k na Ryc.III.2.2.), a następnie w ImageJ mierzono kąt nachylenia każdego prążka względem y_k w różnych regionach ściany (w części równowąskiej oraz na końcach każdej komórki). Analogicznie do kątów nachylenia fibryl celulozowych przyjęto, że kąty te mają wartości w zakresie od -90° do 90° . Ponieważ jednak kąty nachylenia prążków mierzono dla ścian peryklinalnych oglądanych od zewnątrz komórek, podczas gdy kąty nachylenia fibryl mierzono dla ścian oglądanych od wewnątrz, przyjęto, że kąty nachylenia prążków mają wartości ujemne na prawo od długiej osi komórki a dodatnie na lewo, czyli odwrotnie do kątów nachylenia fibryl.

III.3. Metody analizy odkształceń komórek epidermy cebuli towarzyszących plazmolizie oraz deplazmolizie.

III.3.1. Obserwacje przyżyciowe epidermy w mikroskopie konfokalnym.

Z fragmentów łusek o wymiarach 0,5cm x 0,5cm za pomocą żyłki wycinano skrawki paradermalne zawierające epidermę adaksjalną wraz z cienką warstwą leżącego pod nią miękiszu, zachowanego aby wydłużyć czas życia komórek. Tak przygotowane skrawki umieszczano na 10-15 min w 0,1% roztworze jodku propidyny (*propidium iodide* – PI; Hamant i in. 2014) przygotowanym na wodzie dejonizowanej lub 1% NaCl, w zależności od przeprowadzanego wariantu eksperymentu (Tabela III.3.1.). Po tym czasie, zależnie od wariantu, skrawki przepłukiwano odpowiednio wodą dejonizowaną lub 1% NaCl, umieszczano na szkiełku nakrywkowym w kropli medium użytego do przepłukiwania i przykrywano drugim szkiełkiem nakrywkowym. PI przygotowywano na wodzie dejonizowanej (roztwór hipotoniczny) lub 1% NaCl (roztwór izotoniczny; osmolalność 383 mOsm/kg), aby sprawdzić, czy sposób traktowania komórek przed plazmolizą ma wpływ na ich odkształcenie towarzyszące plazmolizie oraz deplazmolizie.

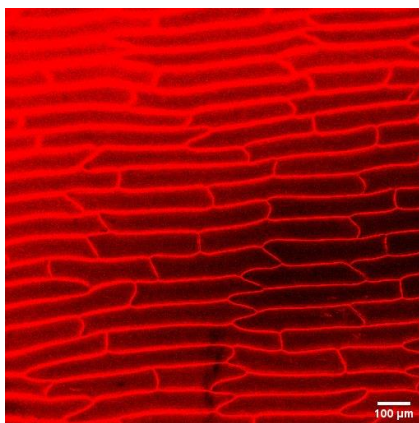
Zastosowanie PI miało na celu wybarwienie ścian komórkowych. Wielu autorów przyjmuje, że jeśli błona komórkowa jest uszkodzona, PI może także wnikać do komórek i łączyć się z DNA, powodując fluorescencję jąder komórkowych (Rounds i in. 2011). Dlatego w trakcie eksperymentu sprawdzano, czy jądra komórek barwią się PI.

	PI na wodzie dejonizowanej (roztwór hipotoniczny)	PI na 1% NaCl (roztwór izotoniczny)
cebula dojrzała	wariant I	wariant III
cebula młoda	wariant II	wariant IV

Tabela III.3.1. Warianty eksperymentu przeprowadzanego z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego.

Przygotowane preparaty obserwowano w odwróconym mikroskopie konfokalnym Olympus FV1000, korzystając z obiektywu o powiększeniu 10x. Do wzbudzenia fluorescencji PI wykorzystywano laser helowo-neonowy emitujący światło zielone o długości fali 543nm. Próbki skanowano na całej grubości komórek epidermy (odległość między skrawkami optycznymi w osi Z wynosiła od 1,13µm do 3µm) wykorzystując oprogramowanie Olympus FluoView FV10-ASW. Sygnał z detektora spektralnego (fotopowielacz) był zbierany w zakresie 560-660nm. Moc lasera oraz wzmocnienie na

fotopowielaczu były dobierane indywidualnie dla każdej próbki (parametry zależały od stopnia wybarwienia preparatu PI) tak, by sygnał był silnie wzmocniony, a obraz przesycony (Ryc.III.3.1.). Takie obrazy dają najlepsze efekty analizy w programie MorphoGraphX (MGX) (Barbier de Reuille i in. 2015). Otrzymane obrazy zapisywano w formie *multistack* w formacie .oib. Następnie na potrzeby MGX pliki te konwertowano do formatu .tif, wykorzystując oprogramowanie Fiji.



Ryc.III.3.1. Przesycony obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający fragment epidermy cebuli barwionej PI przed plazmolizą.

Po przeprowadzeniu pierwszego skanowania próbkę plazmolizowano na szkiełku nakrywkowym w 2,5% NaCl przez 10min i ponownie skanowano zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Następnie przeprowadzano deplazmolizę, traktując próbkę wodą dejonizowaną przez 10min, i znowu skanowano.

III.3.2. Obliczanie odkształcenia objętościowego komórek towarzyszącego plazmolizie oraz deplazmolizie.

Wykorzystując przyżyciowe obrazy epidermy z mikroskopu konfokalnego oraz oprogramowanie MorphoGraphX (MGX) (Barbier de Reuille i in. 2015) obliczano objętość poszczególnych komórek epidermy przed plazmolizą, po plazmolizie oraz po deplazmolizie. Na tej podstawie obliczano względne odkształcenie objętościowe (*Relative Deformation in volume* – RD_{vol}) komórek towarzyszące plazmolizie oraz deplazmolizie, korzystając ze wzorów (2) i (3). Aby możliwe było porównanie odkształceń, w obu przypadkach odkształcenie liczono względem objętości po plazmolizie.

$$(2) \quad RD_{vol(pl)} = [(v_2 - v_1)/v_2] * 100\%$$

$$(3) \quad RD_{vol(dpl)} = [(v_3 - v_2)/v_2] * 100\%$$

, gdzie $RD_{vol(pl)}$ – względne odkształcenie objętościowe komórki towarzyszące plazmolizie,

$RD_{vol(dpl)}$ – deplazmolizie, v_1 – objętość komórki przed plazmolizą, v_2 – po plazmolizie,

v_3 – po deplazmolizie

Ponieważ leżące pod epidermą komórki miększu dawały bardzo silny sygnał PI w mikroskopie konfokalnym, czasami dochodziło do błędów w procesie automatycznej segmentacji komórek w programie MGX (segmentacja polegała na automatycznym wyznaczeniu przestrzeni zajmowanej przez poszczególne komórki, na podstawie sygnału emitowanego przez PI związany ze ścianami tych komórek). Dlatego dla każdej komórki sprawdzano prawidłowość segmentacji i do analiz wybierano wyłącznie komórki prawidłowo zsegmentowane. Ponadto dla każdej komórki określano, czy jej jądro jest zabarwione PI oraz czy komórka sąsiaduje z komórkami o zabarwionym jądrze. Do porównania odkształcenia objętościowego pomiędzy wariantami wybierano wyłącznie komórki o niezabarwionych jądrach, które nie sąsiadowały z komórkami o zabarwionych jądrach.

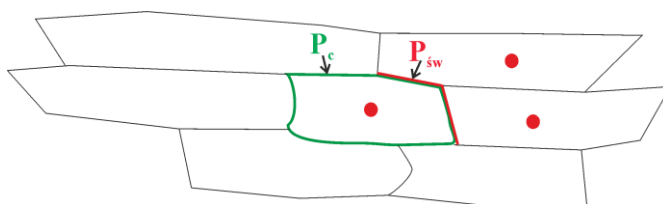
Aby porównać wielkość odkształcenia objętościowego towarzyszącego plazmolizie oraz deplazmolizie poszczególnych komórek, dla każdej z nich obliczano różnicę pomiędzy wartościami bezwzględnymi tych odkształceń (ΔRD_{vol}):

$$(4) \quad \Delta RD_{vol} = | RD_{vol(pl)} | - | RD_{vol(dpl)} |$$

Dla komórek, których jądra barwiły się PI, dodatkowo obliczano względną część obwodu komórki, będącą w kontakcie z komórkami o zabarwionych jądrach ($P_{\text{św}\%}$) według wzoru (5). Obwód mierzono korzystając z oprogramowania ImageJ.

$$(5) \quad P_{\text{św}\%} = (P_{\text{św}}/P_c) * 100\%$$

, gdzie P_c – całkowity obwód komórki, $P_{\text{św}}$ – część obwodu komórki w kontakcie z komórkami, których jądra były zabarwione (Ryc.III.3.2.)



Ryc.III.3.2. Sposób wyznaczania P_c oraz $P_{\text{św}}$. Na zielono zaznaczono cały obwód analizowanej komórki (P_c), natomiast na czerwono część obwodu, która sąsiaduje z komórkami o jądrach zabarwionych PI ($P_{\text{św}}$). Zabarwione jądra zaznaczono jako czerwone kropki.

III.3.3. Obliczanie odkształcenia powierzchniowego zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek epidermy towarzyszącego plazmolizie oraz deplazmolizie.

Do wyznaczenia odkształcenia powierzchniowego wykorzystywano te same obrazy przyżyciowe z mikroskopu konfokalnego, co obrazy wykorzystane w badaniach odkształcenia objętościowego (patrz rozdziały III.3.1-2). W celu obliczenia pola powierzchni zewnętrznej ściany peryklinalnej tej samej komórki epidermy przed plazmolizą, po plazmolizie i po deplazmolizie, przeprowadzano ręczną segmentację powierzchni epidermy w programie MGX (w przeciwieństwie do segmentacji automatycznej wykorzystywanej do obliczania objętości komórek). Względne odkształcenie powierzchniowe (*Relative Deformation in area* - RD_{ar}) ściany towarzyszące plazmolizie oraz deplazmolizie obliczano korzystając ze wzorów (6) i (7). Aby możliwe było porównanie odkształceń, w obu przypadkach odkształcenie liczono względem pola powierzchni ściany po plazmolizie.

$$(6) \quad RD_{ar(pl)} = [(A_2 - A_1) / A_2] * 100\%$$

$$(7) \quad RD_{ar(dpl)} = [(A_3 - A_2) / A_2] * 100\%$$

, gdzie $RD_{ar(pl)}$ – względne odkształcenie powierzchniowe ściany towarzyszące plazmolizie, $RD_{ar(dpl)}$ - deplazmolizie, A_1 – pole powierzchni zewnętrznej ściany peryklinalnej przed plazmolizą, A_2 – po plazmolizie, A_3 – po deplazmolizie

Względne odkształcenie powierzchniowe analizowano dla wszystkich komórek o jądrach niezabarwionych PI, które nie sąsiadowały z komórkami o zabarwionych jądrach.

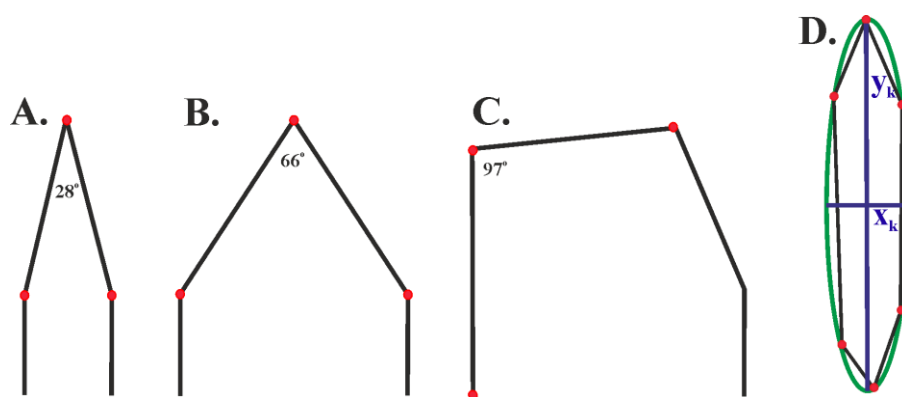
Wykorzystując program MGX obliczano również główne kierunki odkształceń towarzyszących plazmolizie oraz deplazmolizie. Kierunki te w MGX obliczane są dla wielokątów opisanych przez werteksy komórek rzutowane na płaszczyznę przybliżającą współrzędne werteksów (werteksy to miejsca, w których stykają się ściany trzech sąsiednich komórek). Warunkiem koniecznym do prawidłowego obliczenia głównych kierunków odkształceń komórki jest rozpoznanie wszystkich jej werteksów, tj. mapowanie również wszystkich komórek ją otaczających.

III.4. Wykorzystywane parametry opisujące kształt i rozmiar komórek.

Dla każdej komórki, dla której badano MFA lub układ prążków powstających na wewnętrznej powierzchni ściany peryklinalnej, wyznaczano długość oraz kąty obu jej końców. Długość określano jako odległość między najbardziej oddalonymi werteksami komórki. Za kąt końca komórki przyjęto kąt pomiędzy odcinkami łączącymi werteksy w końcowej części komórki (Ryc.III.4.1.A-C). Jeśli koniec komórki nie był wyraźnie

zaostroszony, mierzono dwa kąty na jej końcu, a do analizy wybierano kąt o mniejszej wartości. Na podstawie wartości tak wyznaczonych kątów końce komórek podzielono na trzy kategorie: bardzo ostre (kąt końca komórki $< 50^\circ$), ostre ($50^\circ - 80^\circ$) i tępe ($> 80^\circ$). Długości komórek i kąty końców mierzono na obrazach z mikroskopu świetlnego wykorzystując ImageJ.

Z kolei dla każdej komórki, dla której mierzono odkształcenie, obliczano: obwód wielokąta wyznaczonego przez jej werteksy; pole powierzchni takiego wielokąta; długości osi elipsy opisanej na werteksach komórki (Ryc.III.4.1.D). Pomiary wykonano w ImageJ wykorzystując rzuty prostopadłe powierzchni fragmentów epidermy w stanie przed plazmolizą generowane w programie MGX.



Ryc.III.4.1. A-C. Schematy końców komórek reprezentujących różne kategorie: końce bardzo ostre – wartość kąta końca $< 50^\circ$ (A), końce ostre – wartość kąta końca $50^\circ - 80^\circ$ (B) oraz końce tępe – wartość kąta końca $> 80^\circ$ (C). Czerwone kropki to werteksy, na podstawie których mierzono wartość kąta końca. **D** - długa (y_k) i krótka (x_k) oś elipsy (zielona) najlepiej dopasowanej do werteksów komórki, wyznaczonej przez narzędzie *Fit Ellipse* ImageJ. Na czarno zaznaczono wielokąt przybliżający obwód komórki; czerwone punkty wyznaczają jej werteksy.

Następnie obliczano stosunek długości długiej do krótkiej osi elipsy dopasowanej do werteksów oraz współczynnik kolistości komórki (*circularity* wg Armour i in. 2015), korzystając ze wzoru (8).

$$(8) \quad c = 4\pi A/P^2$$

, gdzie A- pole powierzchni wielokąta opisanego przez werteksy komórki, P- długość obwodu wielokąta

Wartość współczynnika kolistości (c) równa 1 oznacza idealne koło, a im wartość współczynnika jest mniejsza, tym bardziej złożony jest analizowany kształt.

III.5. Narzędzia komputerowe wykorzystywane do opracowania wyników.

W badaniach korzystano z następujących programów komputerowych: CorelDraw X7 (Corel Corporation), Fiji (<https://fiji.sc/>), ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>), ImageJ FibrilTool (Boudaoud i in. 2014), Excel oraz Word (Microsoft Office), MorphoGraphX (Barbier de Reuille i in. 2015), Statistica 13.1 (StatSoft), Matlab (The MathWorks).

Wykorzystane testy statystyczne omówiono na bieżąco, w odpowiednich częściach rozdziału IV. Wyniki.

IV. Wyniki.

IV.1. Względne odkształcenie objętościowe komórek epidermy towarzyszące plazmolizie oraz deplazmolizie.

Odkształcenie komórek obliczano na podstawie pomiarów ich objętości uzyskanych z wykorzystaniem przyżyciowego obrazowania w mikroskopie konfokalnym. Jodek propidyny (*Propidium Iodide* - PI), którym barwiono ściany komórkowe, w niektórych komórkach barwił również jądra. W epidermie cebuli dojrzałej (warianty I i III) jądra zabarwione PI zaobserwowano tylko u 0,8-2,2% komórek po plazmolizie i 2,9-9,2% komórek po deplazmolizie. Natomiast w epidermie młodej cebuli stwierdzono stosunkowo dużą liczbę komórek z zabarwionymi jądrami. W szczególności, w epidermie młodej cebuli barwionej PI rozpuszczonym w wodzie, czyli roztworem hipotonicznym (wariant II doświadczenia; patrz Materiał i metody; tabela III.3.1), zabarwione PI jądra pojawiały się już po plazmolizie, natomiast w epidermie młodej cebuli barwionej roztworem PI przygotowanym na 1% NaCl, czyli roztworem izotonicznym (wariant IV), zabarwione jądra obserwowano dopiero po deplazmolizie. Ponieważ w literaturze często wybarwianie się jąder PI uważane jest za oznakę uszkodzenia błony komórkowej i śmierci komórki (Rounds i in. 2011), porównanie odkształcenia komórek pomiędzy poszczególnymi wariantami eksperymentu przeprowadzono w dwóch etapach. Najpierw analizowano komórki o jądrach niezabarwionych PI, które dodatkowo nie sąsiadowały z komórkami o zabarwionych jądrach (rozdział IV.1.1). Następnie analizowano komórki o jądrach zabarwionych PI (rozdział IV.1.2). Do analiz wybierano wyłącznie takie komórki epidermy, dla których możliwe było obliczenie względnego odkształcenia objętościowego (*Relative Deformation in volume* – RD_{vol}) towarzyszącego zarówno plazmolizie, jak i deplazmolizie.

IV.1.1. Względne odkształcenie objętościowe komórek epidermy o jądrach niezabarwionych PI.

Analizę odkształcenia przeprowadzono dla:

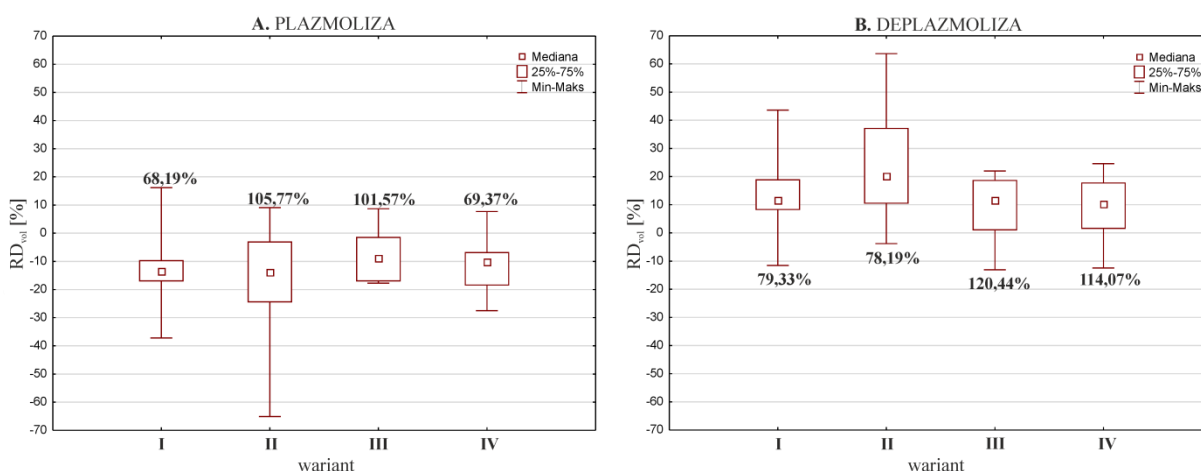
- 47 komórek pochodzących z 9 skrawków w wariantcie I (cebula dojrzała, PI w roztworze hipotonicznym),
- 65 komórek z 9 skrawków w wariantcie II (cebula młoda, PI w r-rze hipotonicznym),
- 21 komórek z 4 skrawków w wariantcie III (cebula dojrzała, PI w r-rze izotonicznym),
- 42 komórek z 9 skrawków w wariantcie IV (cebula młoda, PI w r-rze izotonicznym).

Zgodnie z oczekiwaniami stwierdzono, że dla większości komórek plazmolizie towarzyszy zmniejszenie ich objętości, czyli względne odkształcenie objętościowe ma wartość ujemną (Ryc.IV.1.1.A), a deplazmolizie – zwiększenie objętości (dodatnia wartość względnego odkształcenia objętościowego; Ryc.IV.1.1.B).

Odkształcenie towarzyszące plazmolizie: Największe wartości bezwzględne odkształcenia zaobserwowano w komórkach pochodzących z młodych cebul, które przed plazmolizą barwiono PI w r-rze hipotonicznym (wariant II), a najmniejsze w komórkach pochodzących z dojrzałych cebul, które przed plazmolizą barwiono PI w r-rze izotonicznym (wariant III). Jednak we wszystkich analizowanych wariantach odkształcenie charakteryzowało się dużą zmiennością: współczynnik zmienności (*coefficient of variation* - cv) był wysoki, osiągając wartości powyżej 100% w wariantach II i III (Ryc.IV.1.1.A).

Odkształcenie towarzyszące deplazmolizie: Wartości odkształcenia w komórkach epidermy, które barwiono PI w r-rze hipotonicznym (wariant I i II), były większe niż w komórkach, które barwiono PI w r-rze izotonicznym (wariant III i IV). Podobnie jak w przypadku odkształcenia towarzyszącego plazmolizie, we wszystkich wariantach odkształcenie było bardzo zmienne: wartość cv we wszystkich wariantach była wysoka, a przekraczała 100% w wariacie III i IV (Ryc.IV.1.1.B).

Zatem największe zmiany objętości komórek (czyli największe bezwzględne wartości RD_{vol}), towarzyszące zarówno plazmolizie jak i deplazmolizie, stwierdzono w epidermie młodych cebul, którą przed plazmolizą barwiono PI w r-rze hipotonicznym (wariant II) (Ryc.IV.1.1.A i B).



Ryc.IV.1.1. Względne odkształcenia objętościowe (RD_{vol}) komórek epidermy cebuli towarzyszące plazmolizie (A) oraz deplazmolizie (B) w poszczególnych wariantach eksperymentu. „Pudełka” wskazują na zakresy wartości obejmujące 2. i 3. kwartyl. Dla każdego wariantu podano cv w %.

W celu sprawdzenia, czy różnice w odkształceniu komórek pomiędzy wariantami są istotne statystycznie, przeprowadzono testy parametryczne (test t-Studenta), gdy obie porównywane próby miały rozkład normalny, lub nieparametryczne (test U Manna-Whitneya), gdy jedna lub obie porównywane próby nie miały rozkładu normalnego. Normalność rozkładów sprawdzano testem Shapiro-Wilka. Wyniki porównania przedstawiono w Tabeli IV.1.1.

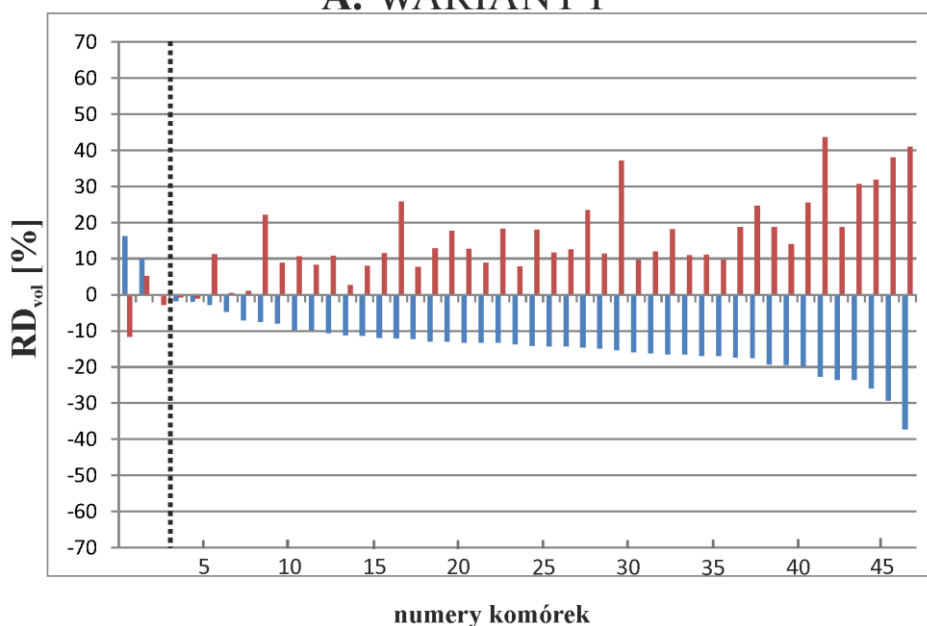
warianty	I	II	III	IV
I	—	PLAZMOLIZA: $p = 0,759160$	PLAZMOLIZA: $p = 0,197888$	PLAZMOLIZA: $p = 0,434504$
II	DEPLAZMOLIZA: $p = 0,014415$	—	PLAZMOLIZA: $p = 0,064369$	PLAZMOLIZA: $p = 0,434504$
III	DEPLAZMOLIZA: $p = 0,055821$	DEPLAZMOLIZA: $p = 0,002926$	—	PLAZMOLIZA: $p = 0,155150$
IV	DEPLAZMOLIZA: $p = 0,016678$	DEPLAZMOLIZA: $p = 0,000104$	DEPLAZMOLIZA: $p = 0,970535$	—

Tabela.IV.1.1. Wyniki testów statystycznych sprawdzających istotność różnic we względnym odkształceniu objętościowym komórek epidermy pomiędzy wariantami eksperymentu. Czerwonym kolorem zaznaczono wartości p wskazujące na różnice istotne statystycznie ($P < 0,05$).

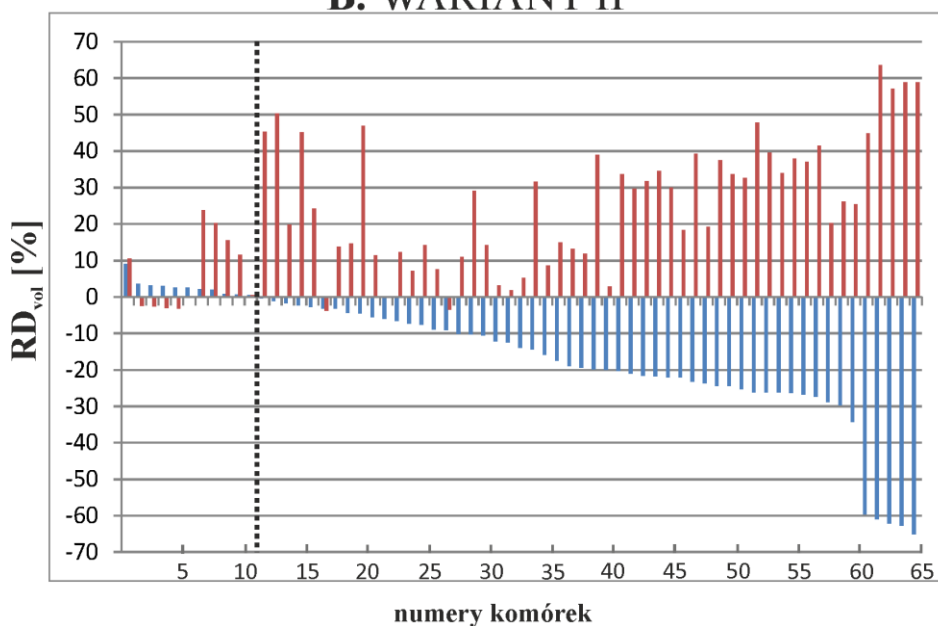
W przypadku plazmolizy średnie wartości względnego odkształcenia objętościowego komórek nie różniły się istotnie pomiędzy poszczególnymi wariantami eksperymentu (Tabela.IV.1.1). Oznacza to, że ani stopień dojrzałości cebuli, z której pochodzą próbki (cebula młoda, czy dojrzała), ani sposób traktowania komórek przed plazmolizą (PI przygotowany na roztworze hipotonicznym, czy izotonicznym) nie wpływały na wielkość odkształcenia komórek. Natomiast w przypadku odkształcenia komórek towarzyszącego deplazmolizie, stwierdzono statystycznie istotne różnice: odkształcenie w wariancie II różniło się istotnie od wszystkich pozostałych wariantów, a odkształcenie w wariancie IV różniło się istotnie od wariantu I (Tabela.IV.1.1). Odkształcenie w wariancie II doświadczenia, w którym epidermę pochodzącą z młodej cebuli barwiono PI w r-rze hipotonicznym, odbiega więc najbardziej od pozostałych wariantów. Warto też podkreślić, że w wariancie tym stwierdzono największe wartości bezwzględne mediany oraz maksymalnego odkształcenia towarzyszącego zarówno plazmolizie, jak i deplazmolizie.

Ponieważ w każdym wariancie doświadczenia odkształcenia objętościowe towarzyszące zarówno plazmolizie, jak i deplazmolizie wykazywały dużą zmienność, w kolejnym etapie analizy sprawdzono, jakim odkształceniom ulegają poszczególne komórki (Ryc.IV.1.2). Analiza taka wykazała, że w każdym z wariantów niewielka grupa komórek zachowywała się w sposób niezgodny z oczekiwaniami, tzn. ich objętość zwiększała się po plazmolizie (na Ryc.IV.1.2 są to komórki po lewej stronie od przerywanej pionowej linii) i/lub malała po deplazmolizie.

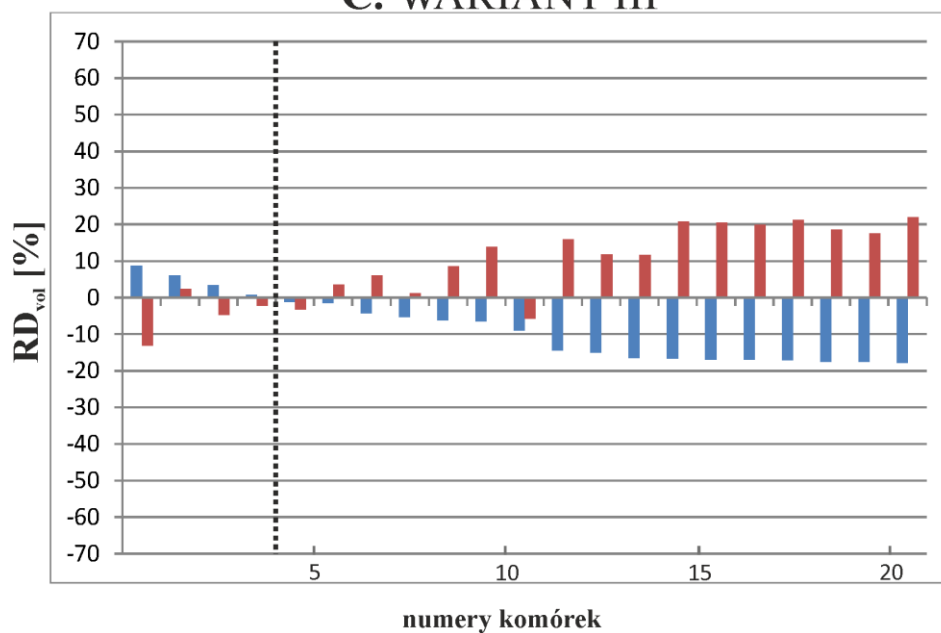
A. WARIANT I



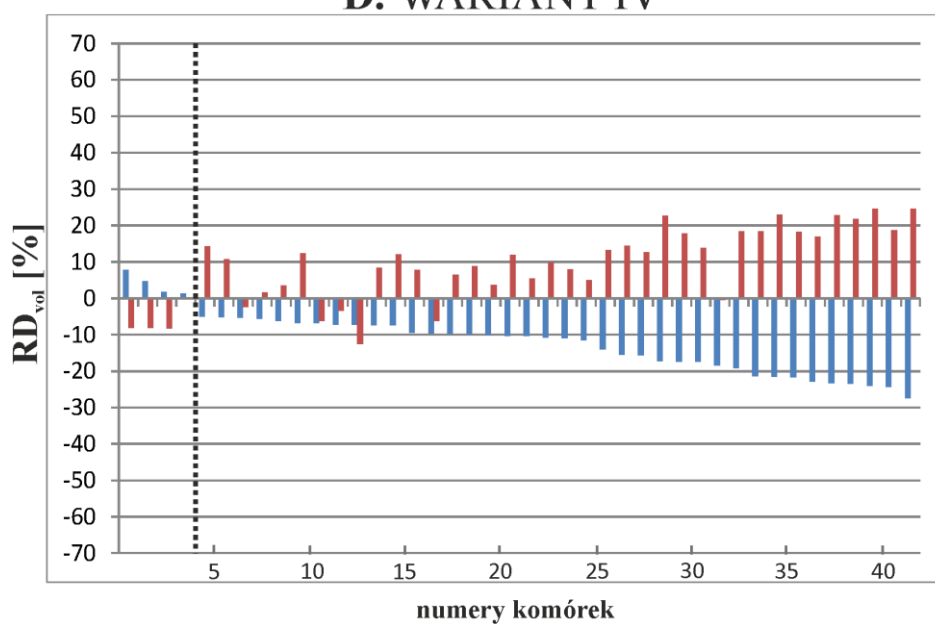
B. WARIANT II



C. WARIANT III

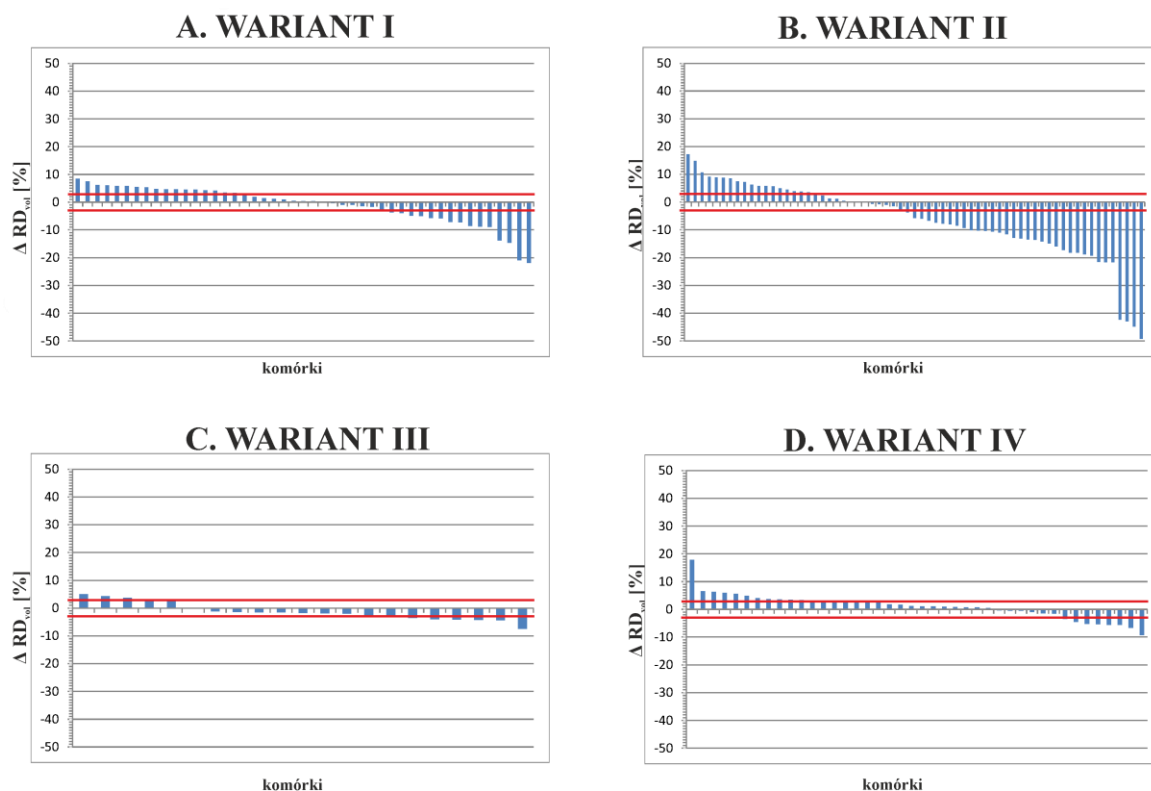


D. WARIANT IV



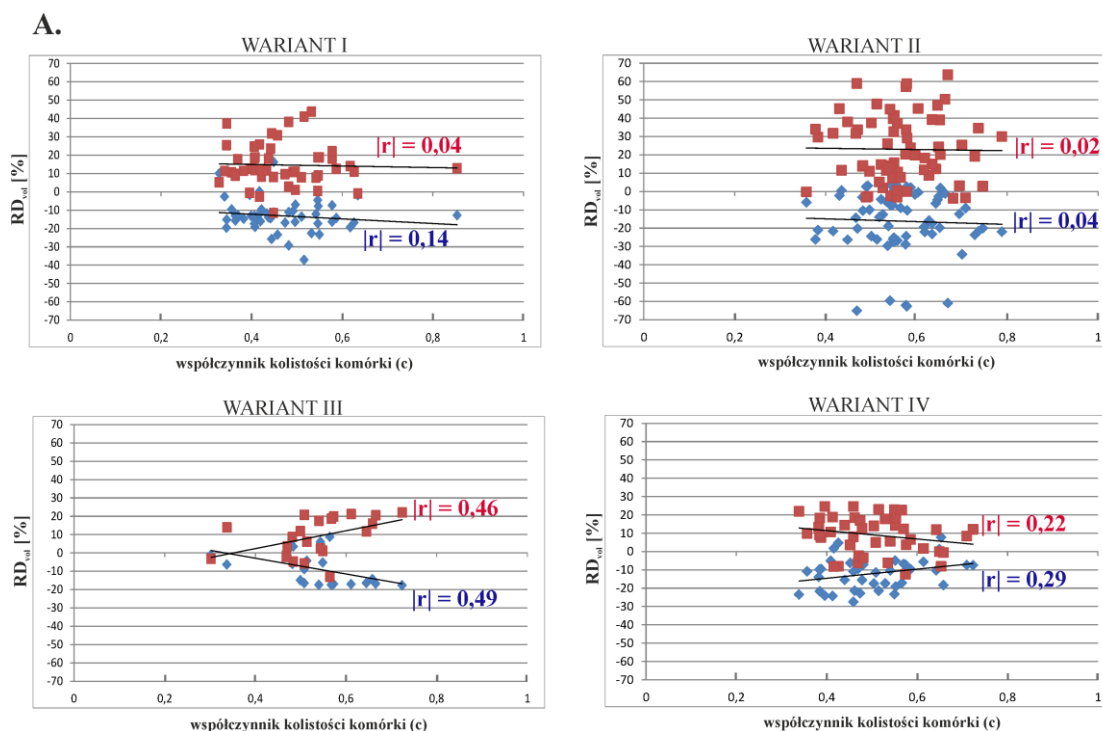
Ryc.IV.1.2. Względne odkształcenia objętościowe (RD_{vol}) poszczególnych komórek epidermy towarzyszące plazmolizie (niebieskie słupki) oraz deplazmolizie (czerwone słupki), osobno dla każdego wariantu doświadczenia. Komórki uporządkowano według malejącej wartości odkształcenia towarzyszącego plazmolizie. Komórki, których objętość nie maleje, ale wzrasta w trakcie plazmolizy, znajdują się po lewej stronie przerywanej linii pionowej.

We wszystkich wariantach doświadczenia wartości bezwzględne odkształceń towarzyszących plazmolizie danej komórki oraz jej deplazmolizie różniły się dla większości komórek (Ryc.IV.1.3). Jednak w każdym wariacie różnice te dla części komórek (32% komórek w wariacie I, 20% - w wariacie II; 48% - III, 50% - IV) nie przekraczały 3% (komórki pomiędzy czerwonymi poziomymi liniami na Ryc.IV.1.3). Najwięcej komórek wykazujących większe różnice pomiędzy odkształceniami towarzyszącymi plazmolizie i deplazmolizie stwierdzono w wariacie II, gdzie różnice te przekraczają 10% dla prawie połowy analizowanych komórek (Ryc.IV.1.3.B). Oznacza to, że duża część komórek epidermy młodych cebul, zanurzonych w roztworze hipotonicznym przed plazmolizą, zmieniała objętość znacznie bardziej w trakcie deplazmolizy niż w trakcie plazmolizy.

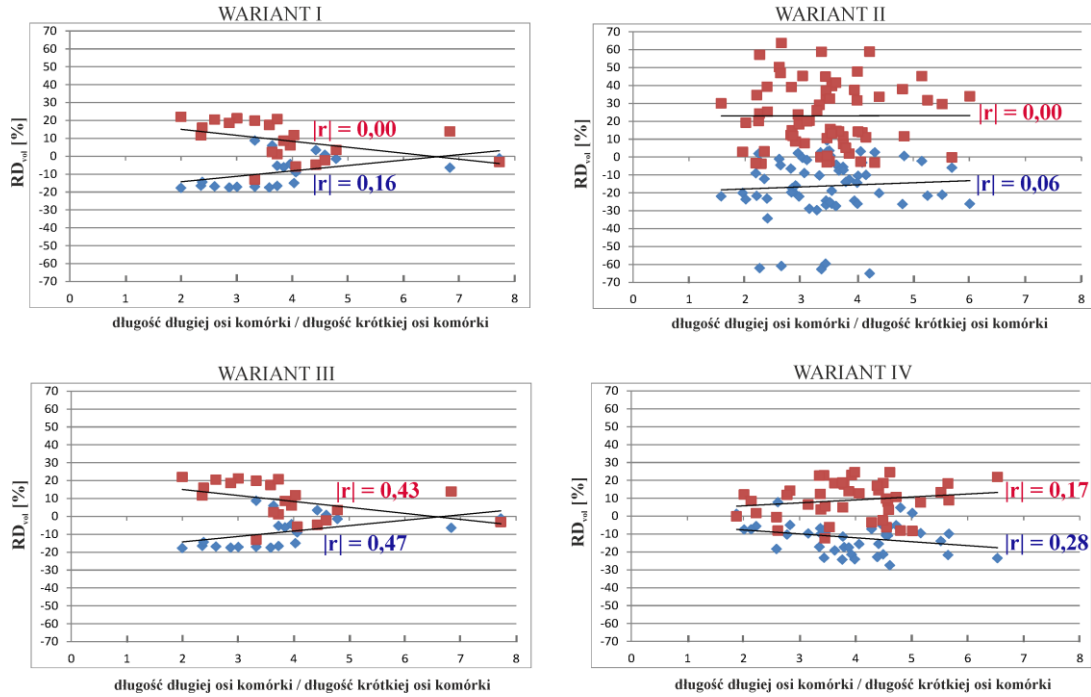


Ryc.IV.1.3. Różnice pomiędzy bezwzględnymi wartościami odkształcenia objętościowego towarzyszącego plazmolizie i deplazmolizie (ΔRD_{vol}) dla poszczególnych komórek w analizowanych wariantach. Komórki uporządkowano według malejącej wartości ΔRD_{vol} .

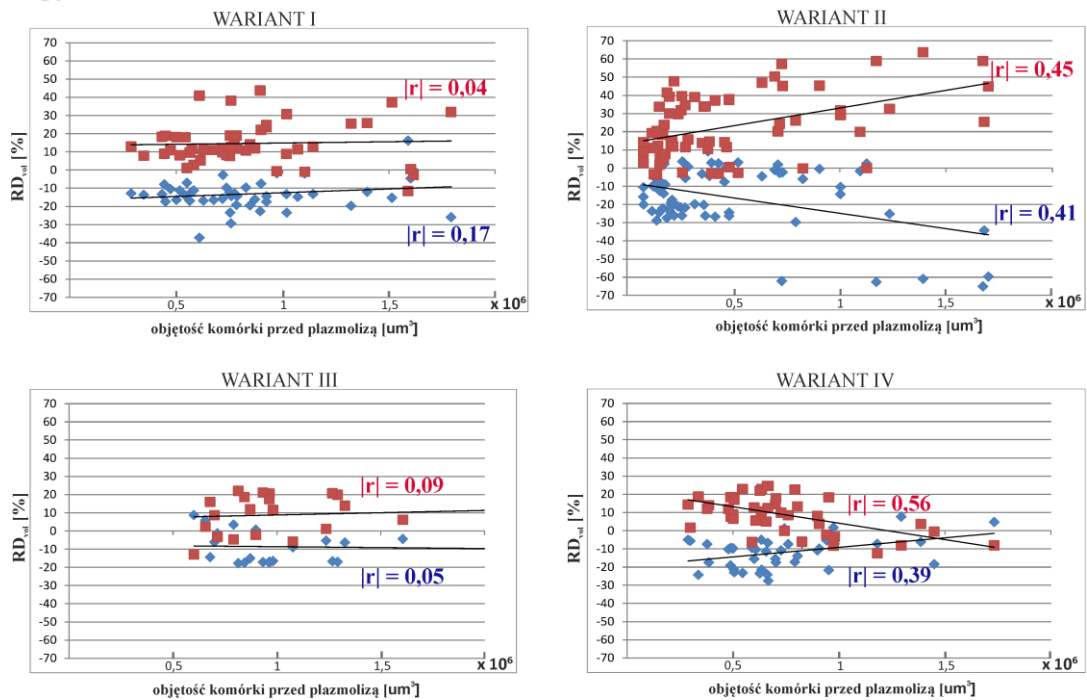
Następnie sprawdzono, czy zaobserwowane zróżnicowanie odkształcenia komórek towarzyszącego plazmolizie lub deplazmolizie wiąże się ze zróżnicowaniem kształtu i rozmiarów komórek. Dla każdego wariantu zbadano zależność względnego odkształcenia objętościowego od kształtu komórki, opisanego współczynnikiem kolistości (c) (Ryc.IV.1.4.A) lub stosunkiem długości osi długiej do osi krótkiej komórki (Ryc.IV.1.4.B), oraz od objętości komórki przed plazmolizą (Ryc.IV.1.4.C). Dla badanych zależności wyznaczono współczynniki korelacji, osobno dla każdego wariantu. Wyższe wartości współczynnika korelacji, świadczące o przeciętnej korelacji, stwierdzono jedynie dla zależności pomiędzy odkształceniem a kształtem komórki (współczynnikiem kolistości, stosunkiem długości osi komórki) w przypadku wariantu III (Ryc.IV.1.4.A i B) oraz pomiędzy odkształceniem a objętością komórki w przypadku wariantów II i IV (Ryc.IV.1.4.C). W pozostałych przypadkach nie stwierdzono korelacji. Prawdopodobnie więc w komórkach pochodzących z dojrzałych cebul (wariant III) na odkształcenie objętościowe może wpływać kształt komórek, zaś w komórkach pochodzących z młodych cebul (warianty II i IV) wielkość względnego odkształcenia związana jest z rozmiarem komórek.



B.



C.



Ryc.IV.1.4. Względne odkształcenie objętościowe (RD_{vol}) komórek towarzyszące plazmolizie (niebieskie romby) oraz deplazmolizie (czerwone kwadraty) w zależności od współczynnika kolistości komórki (c) (A), stosunku długości długiej osi elipsy, dopasowanej do werteksów komórki, do długości osi krótkiej (B) oraz objętości komórki przed plazmolizą (C). Czarne linie na wykresach to linie trendu wyznaczone osobno dla odkształcenia towarzyszącego plazmolizie oraz deplazmolizie.

$|r|$ to współczynnik korelacji.

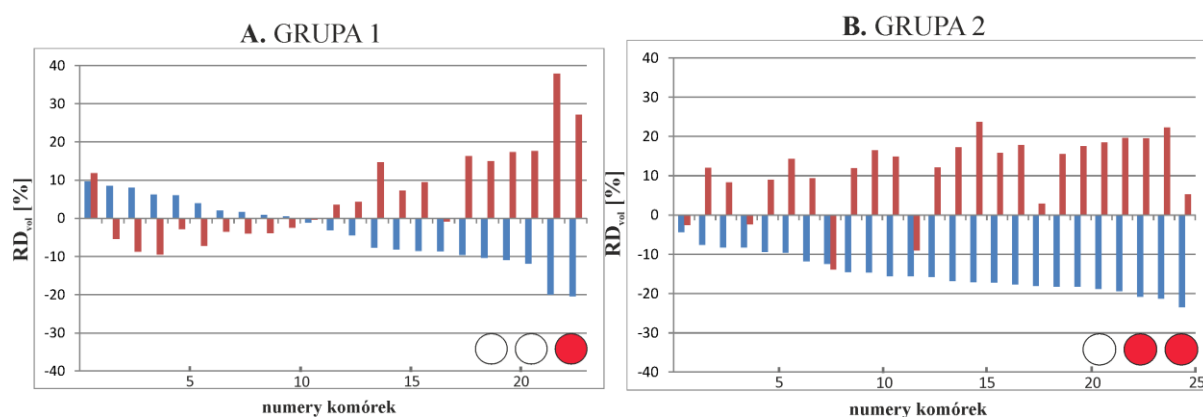
IV.1.2. Komórki epidermy o jądrach zabarwionych PI.

Względne odkształcenie objętościowe (RD_{vol}) komórek epidermy z zabarwionymi jądrami analizowano tylko dla wariantu II doświadczenia (epiderma cebul młodych, barwiona PI w roztworze hipotonicznym), gdzie liczba takich komórek była największa.

Komórki podzielono na dwie grupy:

- grupa 1 obejmująca 23 komórki, w których zabarwienie jąder stwierdzono później, czyli dopiero po deplazmolizie
- grupa 2 obejmująca 26 komórek, w których zabarwienie jąder stwierdzono już po plazmolizie (jądra pozostawały zabarwione także po deplazmolizie)

Dla każdej z grup sporządzono wykresy słupkowe przedstawiające względne odkształcenie objętościowe poszczególnych komórek towarzyszące plazmolizie oraz deplazmolizie (Ryc.IV.1.5).



Ryc.IV.1.5. Względne odkształcenie objętościowe (RD_{vol}) komórek towarzyszące plazmolizie (niebieskie słupki) oraz deplazmolizie (czerwone słupki) dla grupy 1 (A) oraz grupy 2 (B). Kółka w prawym dolnym rogu wykresów symbolizują stan jąder komórkowych w danej grupie w kolejnych etapach eksperymentu: przed plazmolizą, po plazmolizie, po deplazmolizie (białe - jądro niezabarwione PI, czerwone - zabarwione PI). W grupie 2 pominięto jedną komórkę, której odkształcenie towarzyszące plazmolizie wynosiło - 88%, a deplazmolizie 144%, ponieważ tak odbiegające od reszty komórek wartości utrudniałyby analizę wykresów. Komórki uporządkowano według malejącej wartości odkształcenia towarzyszącego plazmolizie (podobnie jak na Ryc.IV.1.2)

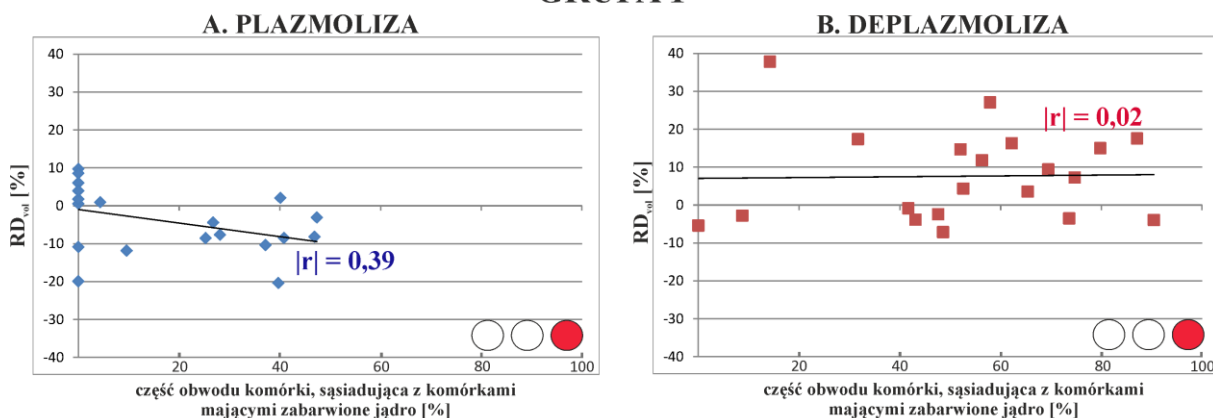
Zestawienia odkształceń towarzyszących plazmolizie i deplazmolizie dla poszczególnych komórek o zabarwionych jądrach przypominają w różnym stopniu analogiczne zestawienia dla komórek o jądrach niezabarwionych (porównaj Ryc.IV.1.5

i Ryc.IV.1.2). W grupie 1 (Ryc.IV.1.5.A) znacznie większy jest udział komórek, których odkształcenia były niezgodne z oczekiwaniami (plazmolizie towarzyszyło zwiększenie objętości, a deplazmolizie - zmniejszenie lub rzadziej zwiększenie). Natomiast odkształcenia zgodne z oczekiwaniami (plazmolizie towarzyszyło zmniejszenie objętości, a deplazmolizie - zwiększenie) stwierdzono tylko w niespełna połowie komórek. W grupie 2 (Ryc.IV.1.5.B) odkształcenia większości komórek były zgodne z oczekiwaniami. Wyniki te wydają się zaskakujące, ponieważ w grupie 2, gdzie odkształcenia komórek przypominają bardziej komórki o niebarwiących się jądrach, barwienie PI, które może oznaczać śmierć komórek, pojawiało się wcześniej niż w grupie 1. Mogłoby to być związane z zależnością odkształcenia komórek martwych od odkształcenia komórek sąsiednich, stwierdzoną przez innych autorów (Routier-Kierzkowska i in. 2012). Dlatego w następnej kolejności sprawdzono stan jąder komórek sąsiadujących z komórkami analizowanymi w obu grupach. Dla każdej analizowanej komórki obliczono, jaki procent jej obwodu sąsiaduje z komórkami, które mają zabarwione jądro. W analizie pominięto komórki leżące na granicy pola widzenia mikroskopu, dla których nie można było określić stanu jąder wszystkich komórek sąsiednich. Zależność odkształcenia komórek od tego, jaka część ich obwodu (określona w %) sąsiaduje z komórkami z zabarwionymi jądrami, prezentuje Ryc.IV.1.6. W grupie 1 oraz w mniejszym stopniu w grupie 2 w trakcie trwania eksperymentu (prawdopodobnie tuż przed lub w trakcie deplazmolizy) w otoczeniu analizowanych komórek pojawiły się nowe komórki z zabarwionymi jądrami. W związku z tym, dla wielu analizowanych komórek część obwodu, jaka kontaktowała się z komórkami o zabarwionych jądrach, zwiększała się po deplazmolizie (porównaj np. Ryc.IV.1.6.A i B).

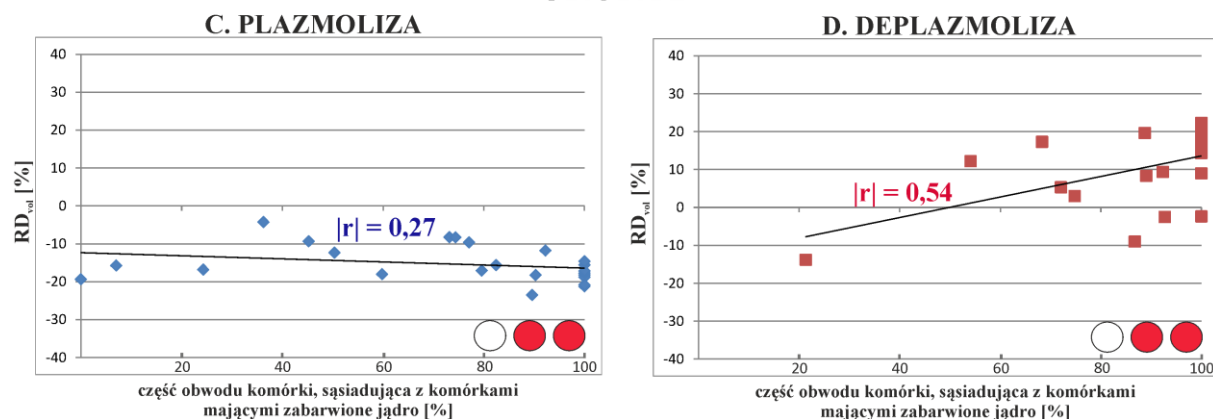
W grupie 1 komórki, których odkształcenie towarzyszące plazmolizie było niezgodnie z oczekiwaniami (plazmolizie towarzyszyło zwiększenie objętości), w większości nie sąsiadowały z komórkami mającymi zabarwione jądra (Ryc.IV.1.6.A). Natomiast niezgodne z oczekiwaniami odkształcenie towarzyszące deplazmolizie (zmniejszenie objętości) nie wiązało się z sąsiedztwem komórek o zabarwionych jądrach lub jego brakiem (Ryc.IV.1.6.B). W grupie 2 większość komórek, które w trakcie deplazmolizy odkształcały się niezgodnie z oczekiwaniami (ich objętość zmniejszała się), to komórki w znacznym stopniu otoczone przez komórki o zabarwionych jądrach (Ryc.IV.1.6.D). Odkształcenie objętościowe komórek towarzyszące deplazmolizie jest w przeciętnym stopniu skorelowane z częścią ich obwodu sąsiadującą z komórkami z zabarwionymi jądrami (Ryc.IV.1.6.D). Poza tym nie stwierdzono innych korelacji. Podsumowując, niezgodne z oczekiwaniami zwiększanie objętości towarzyszące plazmolizie, stwierdzone dla komórek z grupy 1, może być związane

z sąsiedztwem komórek o jądrach niezabarwionych. Można przypuszczać, że komórki z grupy 1, których jądra barwiły się dopiero tuż przed lub w trakcie deplazmolizy, już wcześniej wykazywały zaburzenia i dlatego były bardziej podatne na odkształcenia sąsiednich komórek. Byłoby to zgodne z wynikami innych autorów, którzy stwierdzili, że komórki martwe w trakcie plazmolizy zwiększały objętość poddając się biernie odkształceniu otaczających je żywych komórek (Routier-Kierzkowska i in. 2012). Przeprowadzona analiza nie wyjaśniła jednak, dlaczego odkształcenia większości komórek o wcześniej barwiących się jądrach, czyli potencjalnie martwych już na początku eksperymentu (grupa 2), były takie, jak odkształcenia komórek żywych.

GRUPA 1



GRUPA 2



Ryc.IV.1.6. Zależność względnego odkształcenia objętościowego (RD_{vol}) komórek o jądrach zabarwionych PI, towarzyszącego plazmolizie (A,C) oraz deplazmolizie (B, D), od tego, jaka część obwodu tych komórek sąsiaduje z komórkami o zabarwionych jądrach. A, B – grupa 1; C, D – grupa 2. Kółka w prawym dolnym rogu wykresów symbolizują stan jąder komórek w danej grupie w kolejnych etapach eksperymentu, jak na Ryc.IV.1.5. Czarne linie na wykresach to linie trendu, $|r|$ to współczynnik korelacji.

IV.2. Odształcenie powierzchniowe epidermy towarzyszące plazmolizie oraz deplazmolizie.

IV.2.1. Względne odkształcenie powierzchniowe zewnętrznej ściany peryklinalnej.

Podobnie jak w przypadku względnego odkształcenia objętościowego komórek, do analizy względnego odkształcenia powierzchniowego (*Relative Deformation in area* – RD_{ar}) zewnętrznych ścian peryklinalnych wybrano wyłącznie komórki o jądrach niezabarwionych PI, które dodatkowo nie sąsiadowały z komórkami o zabarwionych jądrach. MorphoGraphX (MGX) umożliwia pół-automatyczną segmentację powierzchni tkanki i jej korektę a, co za tym idzie, prawidłowe rozpoznanie większej liczby komórek niż podczas całkowicie automatycznej segmentacji objętościowej. Dlatego odkształcenie powierzchniowe obliczono dla większej liczby komórek niż odkształcenie objętościowe.

Do analiz wybrano wszystkie komórki, dla których obliczono odkształcenie powierzchniowe towarzyszące plazmolizie lub deplazmolizie (w odróżnieniu do analizy odkształcenia objętościowego, gdzie badano wyłącznie komórki, dla których obliczono odkształcenia towarzyszące obu procesom).

Analizę odkształcenia towarzyszącego plazmolizie przeprowadzono dla:

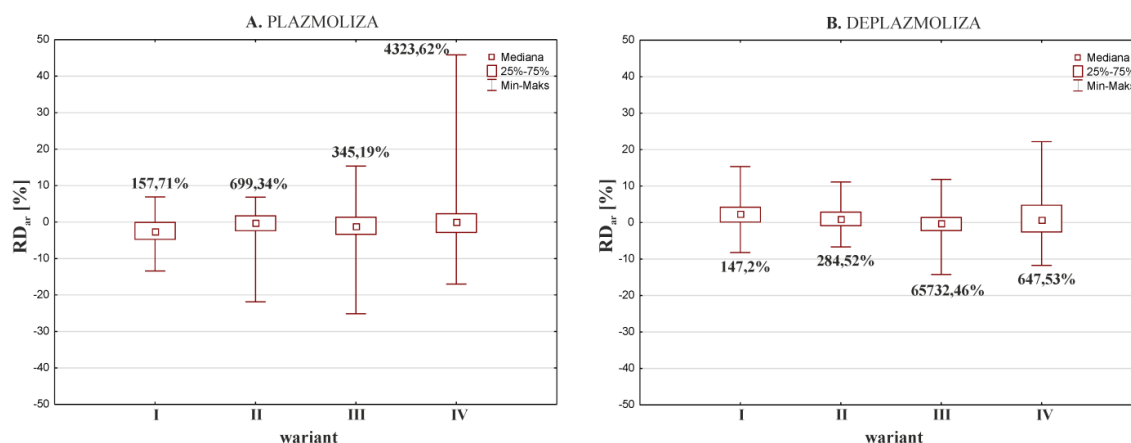
- 178 komórek pochodzących z 9 skrawków w wariancie I,
- 294 komórek z 12 skrawków w wariancie II,
- 141 komórek z 12 skrawków w wariancie III,
- 182 komórek z 10 skrawków w wariancie IV.

Analizę odkształcenia towarzyszącego deplazmolizie przeprowadzono dla:

- 153 komórek z 8 skrawków w wariancie I,
- 218 komórek z 11 skrawków w wariancie II,
- 122 komórek z 9 skrawków w wariancie III,
- 99 komórek z 10 skrawków w wariancie IV.

Stwierdzono, że w dużej liczbie komórek zgodnie z oczekiwaniami plazmolizie towarzyszy zmniejszenie powierzchni zewnętrznej ściany peryklinalnej (względne odkształcenie powierzchniowe ma wartość ujemną; Ryc.IV.2.1.A) a deplazmolizie – zwiększenie (Ryc.IV.2.1.B). Jednak we wszystkich wariantach doświadczenia odkształcenia te były bardzo małe. Większość wartości nie przekraczała -5% i 5% odpowiednio dla plazmolizy i deplazmolizy (Ryc.IV.2.1.), a mediany były bliskie zeru. W każdym wariancie doświadczenia część komórek odkształcała się niezgodnie z oczekiwaniami (zwiększenie powierzchni ściany towarzyszyło plazmolizie a zmniejszenie towarzyszyło deplazmolizie). Współczynniki zmienności dla odkształceń towarzyszących plazmolizie oraz deplazmolizie

były wyjątkowo wysokie; wynosiły kilkaset procent we wszystkich wariantach (Ryc.IV.2.1.). Ze względu na tak małe wartości odkształcenia powierzchniowego, prawdopodobnie bliskie błędowi pomiarów, oraz znaczną zmienność wyników pomiarów zaniechano porównania odkształcenia powierzchniowego pomiędzy poszczególnymi wariantami doświadczenia.

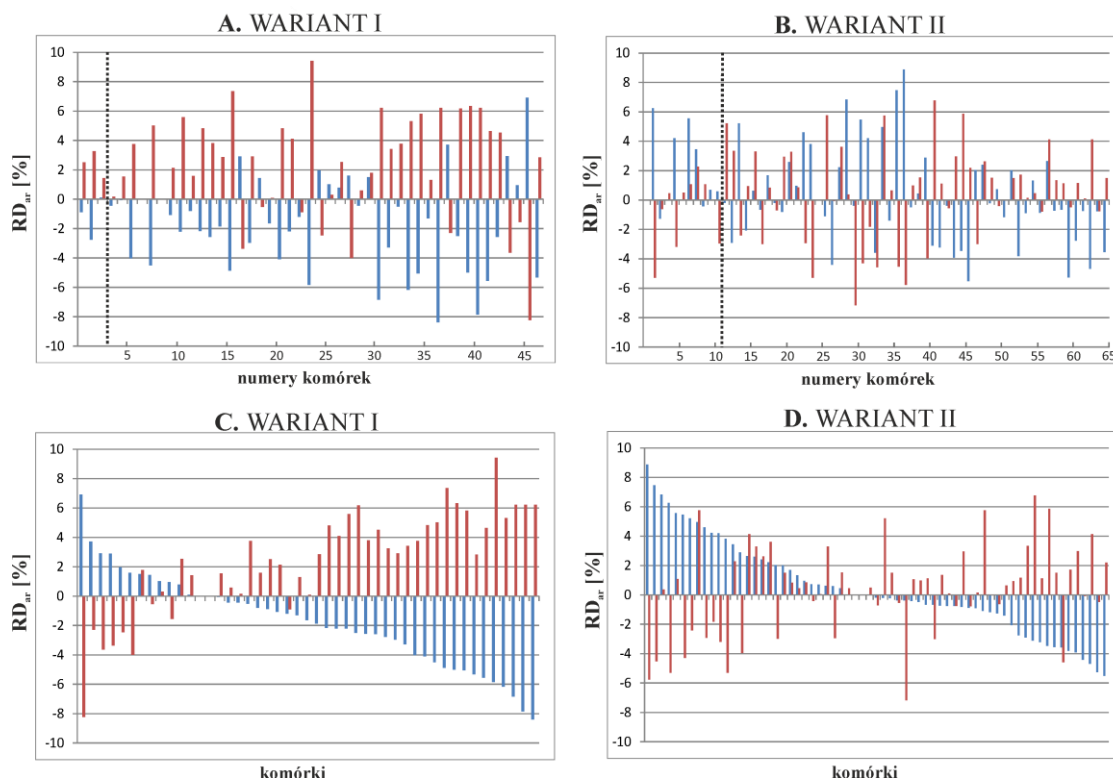


Ryc.IV.2.1. Względne odkształcenia powierzchniowe (RD_{ar}) zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek towarzyszące plazmolizie (A) i deplazmolizie (B) w poszczególnych wariantach. „Pudełka” wskazują na zakresy wartości obejmujące 2. i 3. kwartył. Dla każdego wariantu podano cv w %.

Następnie analizowano odkształcenie powierzchniowe zewnętrznej ściany peryklinalnej tych samych komórek, dla których wcześniej badano odkształcenie objętościowe. Analizę przeprowadzono tylko dla wariantów I i II (warianty o największej liczbie komórek). Dla obu wariantów sporządzono wykresy słupkowe przedstawiające względne odkształcenie powierzchniowe towarzyszące plazmolizie oraz deplazmolizie poszczególnych komórek (Ryc.IV.2.2). By umożliwić porównanie, na wykresach Ryc.IV.2.2.A i B komórki uporządkowano tak samo, jak na wykresach przedstawiających odkształcenie objętościowe (Ryc.IV.1.2.A i B).

Porównanie odkształcenia powierzchniowego i objętościowego tych samych komórek (Ryc.IV.2.2.A, B i Ryc.IV.1.2.A, B) pokazuje, że wartości te nie są powiązane. Nie stwierdzono, na przykład, tendencji by komórki, których odkształcenia objętościowe były zgodne z oczekiwaniami (położone na prawo od linii przerywanej na Ryc.IV.1.2.A i B), wykazywały również zgodne z oczekiwaniami odkształcenia powierzchniowe. Z kolei zestawienia odkształceń powierzchniowych towarzyszących plazmolizie i deplazmolizie dla komórek uporządkowanych zgodnie z malejącym odkształceniem towarzyszącym plazmolizie (Ryc.IV.2.2.C i D), pokazują znaczny udział komórek, których odkształcenia są niezgodne z oczekiwaniami (29% komórek w wariacie I i 62% w wariacie II). Zarówno brak

zależności pomiędzy odkształceniem powierzchniowym i objętościowym, jak i tak duży udział komórek odkształcających się niezgodnie z oczekiwaniami po części tłumaczyć można bardzo małym odkształceniem powierzchniowym.



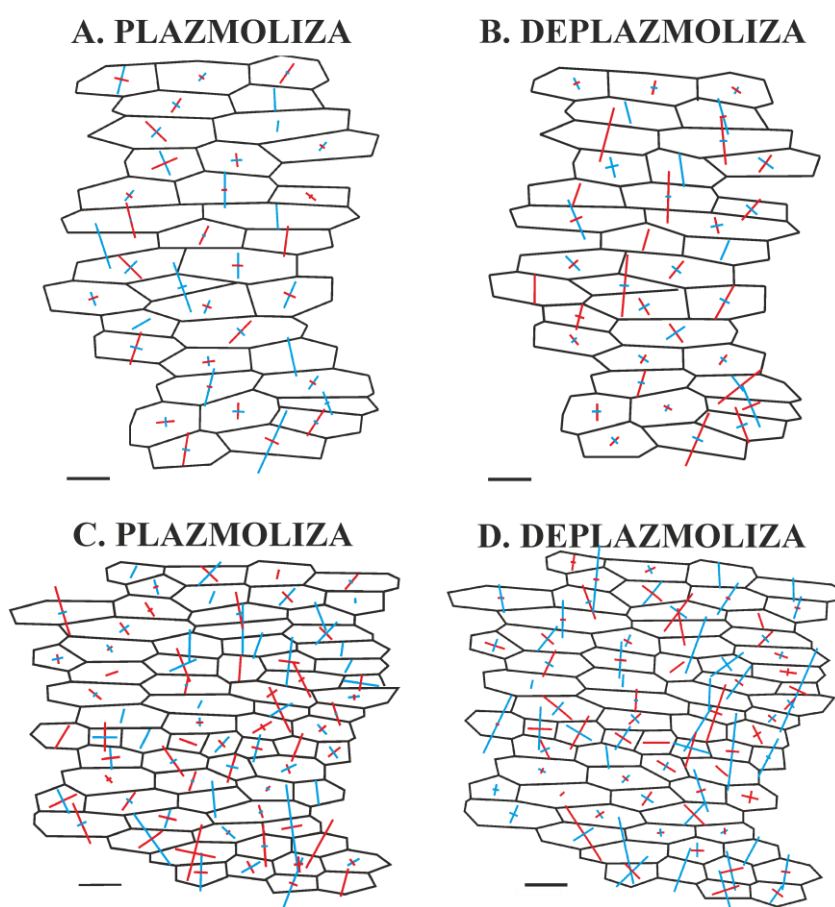
Ryc.IV.2.2. Względne odkształcenie powierzchniowe (RD_{ar}) zewnętrznej ściany peryklinalnej towarzyszące plazmolizie (niebieskie słupki) oraz deplazmolizie (czerwone słupki), dla komórek epidermy, dla których wcześniej analizowano odkształcenie objętościowe (wariant I i II). Na wykresach **A** oraz **B** numery komórek odpowiadają odpowiednio numerom komórek z Ryc.IV.1.2.A oraz B. Puste miejsca na wykresach oznaczają komórki, dla których ze względu na trudności techniczne nie było możliwe obliczenie względnego odkształcenia powierzchniowego. Komórki znajdujące się po lewej stronie przerywanej linii pionowej (**A** i **B**) to komórki, których objętość zwiększała się w trakcie plazmolizy (odkształcenie niezgodne z oczekiwaniami). Na wykresach **C** i **D** przedstawiono odkształcenie tych samych komórek, ale uporządkowanych według malejącej wartości odkształcenia powierzchniowego towarzyszącego plazmolizie.

IV.2.2. Główne kierunki odkształcenia powierzchni epidermy.

Wykorzystując program MGX analizowano również główne kierunki odkształceń powierzchniowych obliczane dla wielokątów opisanych przez werteksy komórek (Ryc.IV.2.3). Choć ze względu na bardzo małe wartości tych odkształceń, obliczone główne kierunki odkształceń obarczone są błędem, mapy przedstawiające główne kierunki

odkształcenia mogą dostarczyć informacji o tym, jaka jest ogólna tendencja anizotropii odkształceń.

Mapy przedstawione na Ryc.IV.2.3 pokazują, że dla dużej liczby komórek kierunek odkształcenia o maksymalnej wartości bezwzględnej (dłuższe ramiona krzyży na Ryc.IV.2.3) był zbliżony do kierunku poprzecznego (prostopadłego do długiej osi komórki). Jednocześnie jednak nie stwierdzono wyraźnej tendencji co do rodzaju tego odkształcenia (kurczenie - czerwone, bądź wydłużanie – niebieskie). Zarówno w trakcie plazmolizy (Ryc.IV.2.3.A i C), jak i deplazmolizy (Ryc.IV.2.3.B i D) część komórek kurczyła się, a część rozciągała w kierunku poprzecznym.

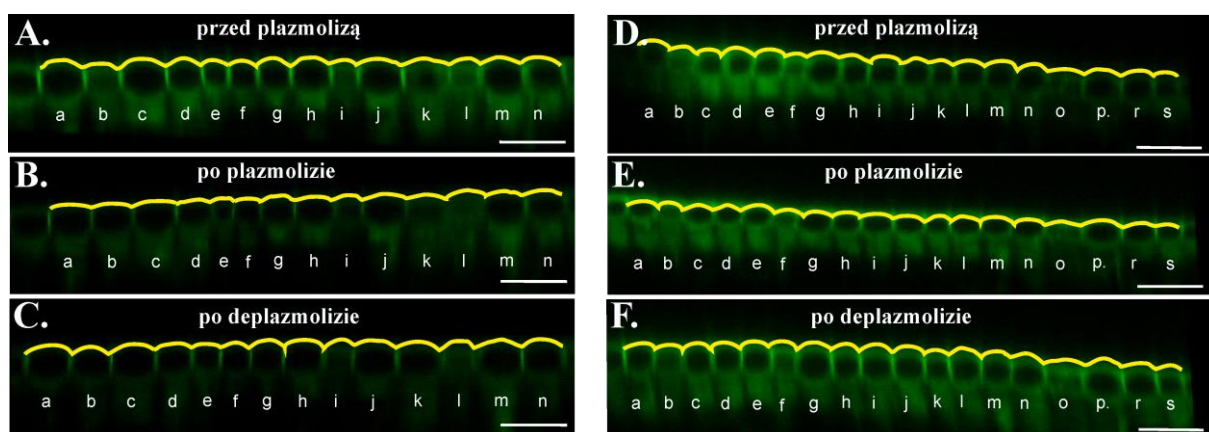


Ryc.IV.2.3. Główne kierunki odkształcenia towarzyszącego plazmolizie (A, C) oraz deplazmolizie (B, D) dla przykładowych dwóch skrawków epidermy z wariantu II (skrawek pierwszy A, B; skrawek drugi - C, D). Ramiona krzyży wskazują na kierunki maksymalnego i minimalnego odkształcenia. Linie czerwone oznaczają kurczenie, linie niebieskie – rozciąganie. Długość linii jest proporcjonalna do wielkości odkształcenia w danym kierunku. Skrawki pochodzą z łusek różnych cebul.

Skala 100µm.

IV.2.3. Zmiany krzywizny zewnętrznej ściany peryklinalnej.

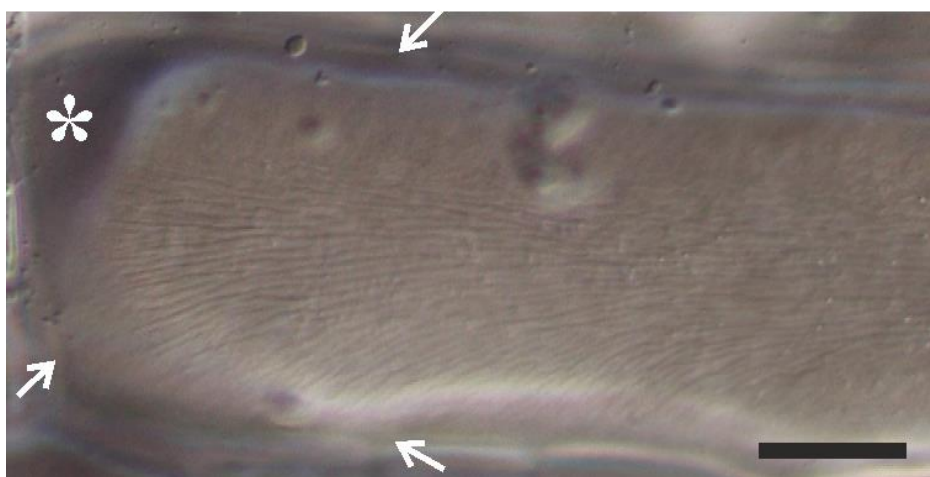
Nawet gdy odkształcenia powierzchniowe zewnętrznej ściany peryklinalnej są niewielkie, plazmolizie oraz deplazmolizie może towarzyszyć zmiana krzywizny ściany w kierunku poprzecznym (Lipowczan i in. 2018). Zmiany te analizowano porównując przekroje poprzeczne przez wybrane komórki epidermy przed plazmolizą, po plazmolizie i po deplazmolizie, wykonane w programie MGX (Ryc.IV.2.4). Wykorzystano fragmenty epidermy z wariantu I (Ryc.IV.2.4.A-C) oraz II (Ryc.IV.2.4.D-F) doświadczenia. Są to warianty, w których PI przygotowywany był na roztworze hipotonicznym, w związku z czym komórki prawdopodobnie pobierały wodę z roztworu podczas barwienia, czyli jeszcze przed plazmolizą. Zewnętrzna ściana peryklinalna komórek przed plazmolizą charakteryzowała się wyraźnie większą krzywizną (kontury ściany zaznaczone żółtą linią na Ryc.IV.2.4.A i D) niż po plazmolizie (Ryc.IV.2.4.B i E). Z kolei deplazmolizie towarzyszyło zwiększenie krzywizny (Ryc.IV.2.4.C i F). Mimo więc małego względnego odkształcenia powierzchniowego, plazmolizie i deplazmolizie towarzyszyły zmiany kształtu ściany komórkowej. Takie zachowanie epidermy można porównać do dmuchanego materaca kieszeniowego. Choć materiał budujący ściany materaca praktycznie nie zmienia powierzchni, po nadmuchaniu materaca krzywizna każdej pojedynczej kieszeni jest duża (analogicznie do stanu przed plazmolizą lub po deplazmolizie), natomiast po spuszczeniu powietrza krzywizna kieszeni zmniejsza się (stan po plazmolizie).



Ryc.IV.2.4. Przekroje poprzeczne przez wybrane komórki dwóch fragmentów epidermy, z wariantu I (A-C) oraz II (D-F). Żółta linia przedstawia zarys zewnętrznych ścian peryklinalnych przed plazmolizą (A i D), po plazmolizie (B i E) oraz po deplazmolizie (C i F). Małymi literami oznaczono te same komórki w kolejnych etapach eksperymentu. Skala 100µm.

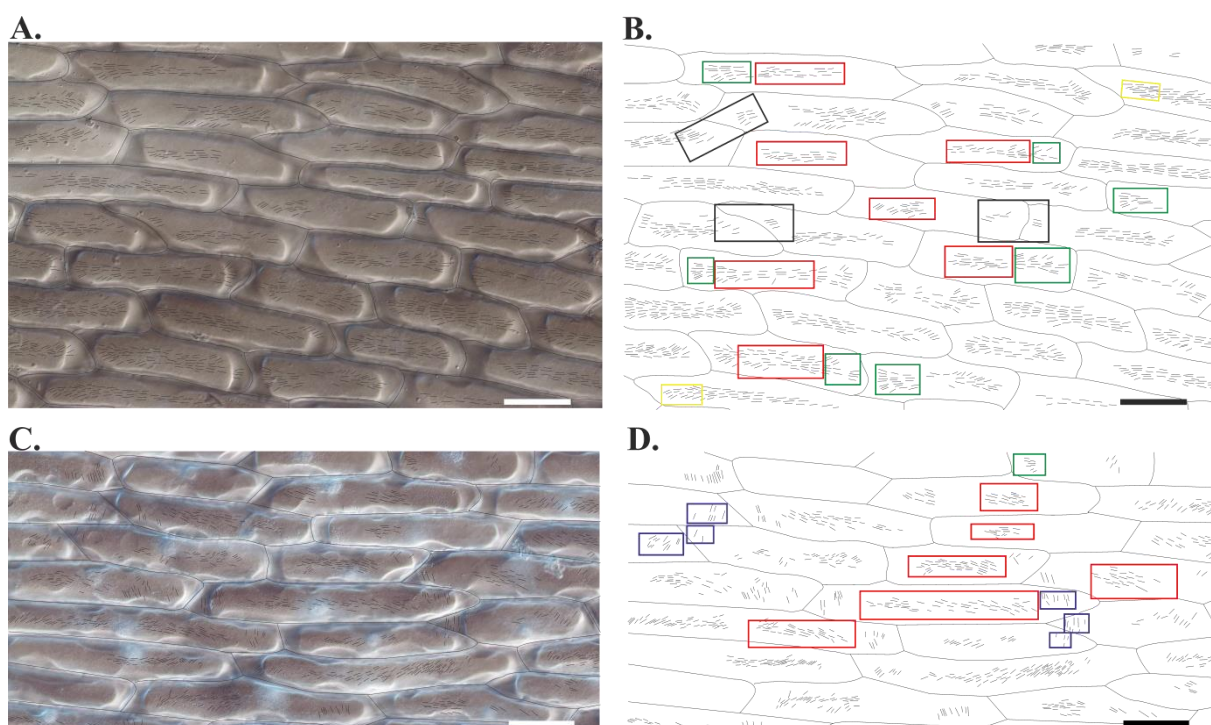
IV.3. Układ prążków na wewnętrznej powierzchni zewnętrznej ściany peryklinalnej epidermy.

Jak opisano we Wstępie (patrz rozdział I.3.5), na skutek zniesienia naprężenia rozciągającego ściany komórkowe epidermy, najmłodsze (wewnętrzne) warstwy ścian peryklinalnych ulegają wyboczeniu (Hejnowicz, Borowska-Wykręt 2005; Lipowczan i in. 2018). Powstające na skutek wyboczenia zmarszczki na wewnętrznej powierzchni ściany widoczne są jako prążki w mikroskopie Nomarskiego. Takie prążki zaobserwowano również na ścianach peryklinalnych epidermy cebuli poddanej plazmolizie (Ryc.IV.3.1). Z literatury wiadomo, że u innych gatunków roślin układ prążków jest prawdopodobnie związany z anizotropią odkształcenia powierzchniowego ściany. Na przykład ściany peryklinalne komórek epidermy hipokotyla słonecznika na skutek zniesienia naprężenia rozciągającego odkształcają się silnie anizotropowo, kurcząc się maksymalnie w kierunku podłużnym (równoległym do długiej osi komórek) (Hejnowicz, Sievers 1995, 1996). Z kolei prążki pojawiające się na wewnętrznej powierzchni tych ścian są zawsze zorientowane poprzecznie (Hejnowicz, Borowska-Wykręt 2005). Dlatego w kolejnym etapie badań analizowano układ prążków, aby na tej podstawie móc wnioskować o anizotropii odkształcenia ściany. Jak wyjaśniono w poprzednim rozdziale, tego typu danych nie można było uzyskać na podstawie analizy obrazów z mikroskopu konfokalnego ze względu na bliską błądowi pomiaru wielkość odkształcenia powierzchniowego.



Ryc.IV.3.1. Widoczne w mikroskopie Nomarskiego prążki, będące efektem wyboczenia najmłodszych warstw zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek epidermy cebuli. Strzałkami zaznaczono ściany antyklinalne, a gwiazdką przestrzeń pomiędzy ścianą a odklejonym od niej podczas plazmolizy protoplastem. Skala 10µm.

Wstępne obserwacje układu prążków na powierzchni ścian peryklinalnych pokazały, że ich orientacja jest zróżnicowana zarówno pomiędzy komórkami, jak i w obrębie ściany pojedynczej komórki. W szczególności, w większości komórek prążki przy końcach komórek były zorientowane inaczej niż w części równowąskiej. Dlatego układ prążków analizowano osobno dla części równowąskiej oraz dla końców komórek, wyróżniając końce o różnym kształcie (patrz część III.4. rozdziału Materiał i metody): bardzo ostre (kąt końca komórki $< 50^\circ$; Ryc.III.4.1.A), ostre (kąt końca 50° - 80° ; Ryc.III.4.1.B) i tępe (kąt końca $> 80^\circ$; Ryc.III.4.1.C).



Ryc.IV.3.2. Mikrofotografie splazmolizowanych komórek adaksjalnej epidermy cebuli uzyskane z wykorzystaniem mikroskopu Nomarskiego (A, C) oraz mapy przedstawiające zarysy tych komórek oraz układ prążków w najmłodszej warstwie zewnętrznej ściany peryklinalnej (B, D). Na czerwono obramowano przykładowe układy prążków w części równowąskiej komórek, na zielono i niebiesko układy na końcach komórek, odpowiednio – fontannowy i poprzeczny. Czarne i żółte obramowania wskazują obszary, w których układ prążków jest ciągły odpowiednio pomiędzy sąsiednimi komórkami oraz pomiędzy bardzo ostrym końcem i częścią równowąską komórki. Skala 50 μ m.

Układ prążków analizowano w dwóch fragmentach epidermy z łusek młodej cebuli, w skład których wchodziło odpowiednio 24 i 35 komórek (Ryc.IV.3.2). W części równowąskiej komórek prążki były najczęściej prawie podłużne, czyli równoległe lub lekko

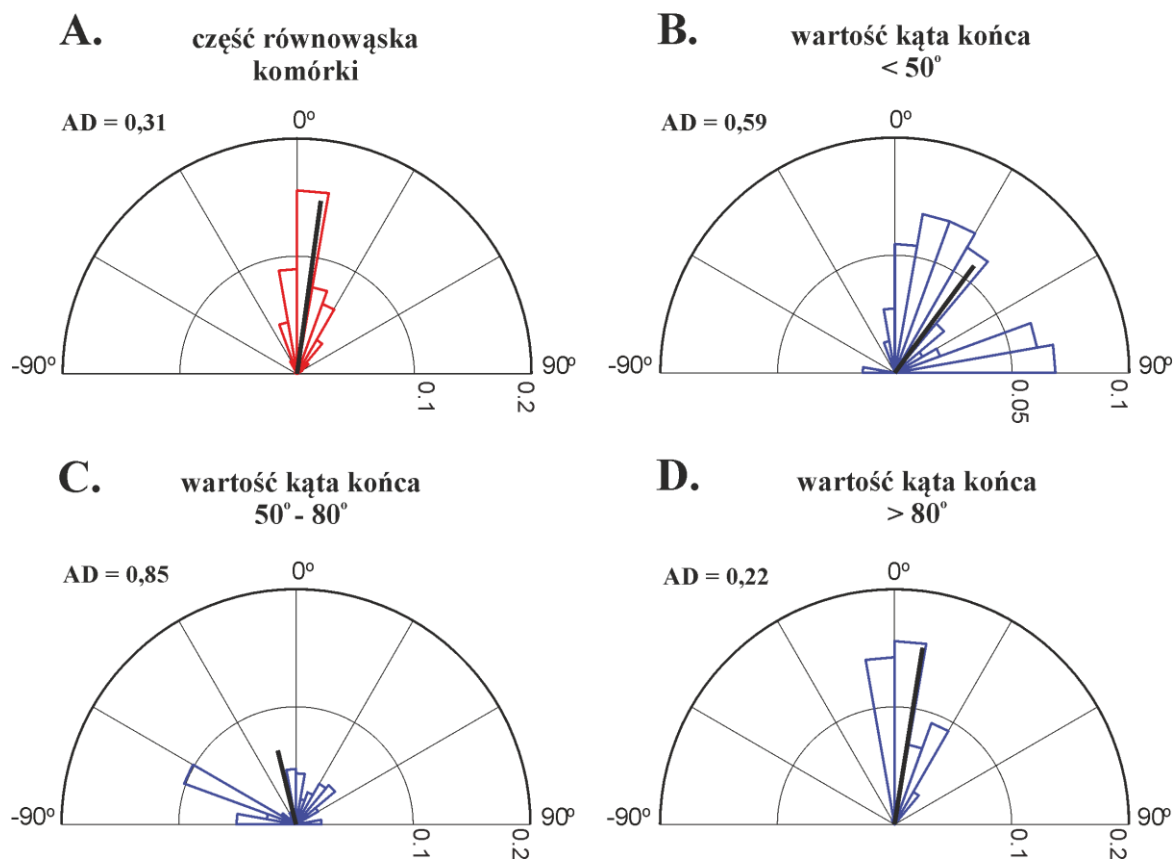
skośne względem długiej osi komórki (Ryc.IV.3.2 czerwone obramowania). Natomiast przy końcach komórek układ prążków był bardziej zróżnicowany. Wyróżnić można było dwa układy: przy końcach tępych podłużny układ prążków z części równowąskiej przechodził stopniowo do układu fontannowego (Ryc.IV.3.2 zielone obramowania), a dla końców ostrych charakterystyczny był układ poprzeczny (Ryc.IV.3.2 niebieskie obramowania). Ponadto zaobserwowano, że układ prążków może tworzyć wzór ponadkomórkowy, czyli ciągły pomiędzy sąsiednimi komórkami (Ryc.IV.3.2 czarne obramowania).

Następnie przeprowadzono analizę zróżnicowania układu prążków, mierząc kąt nachylenia poszczególnych prążków względem długiej osi komórki dla:

- 58 obszarów ściany w części równowąskiej komórek,
- 8 obszarów ściany na bardzo ostrych końcach komórek,
- 19 - na końcach ostrych,
- 13 - na końcach tępych.

Histogramy kątowe oraz wartości odchylenia kąowego (*Angular Deviation* - AD) (Berens 2009), obliczone dla kątów nachylenia prążków w różnych częściach ściany, potwierdziły, że w części równowąskiej komórek (Ryc.IV.3.3.A) orientacja prążków jest prawie podłużna (kąt nachylenia bliski 0°) a ich kąt nachylenia jest słabo zróżnicowany. Podobnie przy końcach tępych (Ryc.IV.3.3.D), gdzie prążki często tworzą układ fontannowy – odbiegający nieznacznie od podłużnego, nachylenie prążków było tylko nieznacznie zróżnicowane. Natomiast przy końcach ostrych i bardzo ostrych stwierdzono dużo większe zróżnicowanie kąta nachylenia prążków (Ryc.IV.3.3.B i C). W przypadku końców bardzo ostrych histogramy wykazały rozkład bimodalny (Ryc.IV.3.3.B): część prążków była zorientowana poprzecznie (kąt bliski 90°) a część prążków – podłużnie. Pierwsza grupa prążków, to prawdopodobnie prążki tworzące układy poprzeczne, jak te obwiedzione na niebiesko na Ryc.IV.3.2, a druga to prawdopodobnie prążki ciągłe z tymi w części równowąskiej komórek, np. obwiedzione na żółto na Ryc.IV.3.2. Na końcach ostrych układ prążków był najbardziej zróżnicowany (Ryc.IV.3.3.C), co prawdopodobnie odzwierciedla przejście układu prążków od podłużnego na skraju części równowąskiej do poprzecznego przy końcu komórki.

Podsumowując, układ prążków, powstających po zniesieniu naprężeń na wewnętrznej powierzchni ściany komórek epidermy cebuli, odbiega od układów prążków opisywanych w literaturze dla innych gatunków. Związane jest to prawdopodobnie z kształtem komórek epidermy cebuli. Innym czynnikiem mogą być właściwości mechaniczne ściany.



Ryc.IV.3.3. Histogramy kątowe prezentujące zróżnicowanie kątów nachylenia prążków względem długiej osi komórki: w części równowaskiej komórek (**A**) oraz na końcach bardzo ostrych (**B**), ostrych (**C**) i tępych (**D**). Kąt 0° na histogramach oznacza kierunek równoległy do długiej osi komórki (czyli podłużny układ prążków), -90° oraz 90° – kierunek prostopadły (czyli poprzeczny układ prążków).

Czarne odcinki to średnie wektory wypadkowe, wskazujące średni kąt nachylenia prążków. Ich długość jest proporcjonalna do koncentracji danych: im większa długość wektora tym mniejsze rozproszenie danych. AD to odchylenie kątowe (Berens 2009), którego wartość waha się od 0 do 1,41 (im większe AD, tym większe rozproszenie danych). Wysokość słupków histogramu wskazuje częstość występowania kątów nachylenia mieszczących się w danym zakresie (częstość równa 0,5 oznacza, że w danym zakresie mieszczą się wartości wszystkich kątów).

IV.4. Układ fibryl celulozowych na wewnętrznej powierzchni zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek epidermy.

Odształcenie ściany komórkowej zależy nie tylko od anizotropii naprężenia, które było znoszone w czasie eksperymentu, ale także od anizotropowych właściwości mechanicznych ściany, które wynikają głównie ze wzmocnienia ściany przez fibryle celulozowe (Burgert, Fratzl 2009; Kerstens i in. 2001; Suslov, Verbelen 2006). Dlatego w dalszej części badań analizowano układ fibryl celulozowych. W niniejszym rozdziale opisano układ fibryl na wewnętrznej powierzchni ściany, czyli powierzchni która ulega wyboczeniu (badany z wykorzystaniem AFM), a kolejny rozdział poświęcono układowi fibryl na całej grubości ściany (badania przy użyciu mikroskopu polaryzacyjnego).

Badania układu fibryl celulozowych przy użyciu AFM prowadzono na fragmentach ścian z równowąskiej części komórek pochodzących z cebul dojrzałych. Badanie fragmentów zlokalizowanych przy końcach komórek nie było możliwe ze względu na opieranie się ramienia sondy AFM na resztkach ścian antyklinalnych pozostałych po rozrywaniu komórek.

Układ fibryl analizowano dla fragmentów ścian, pochodzących z różnych komórek, przygotowanych według czterech różnych procedur (szczegółowy opis procedur zamieszczono w rozdziale III.2.1; Tabela III.2.1):

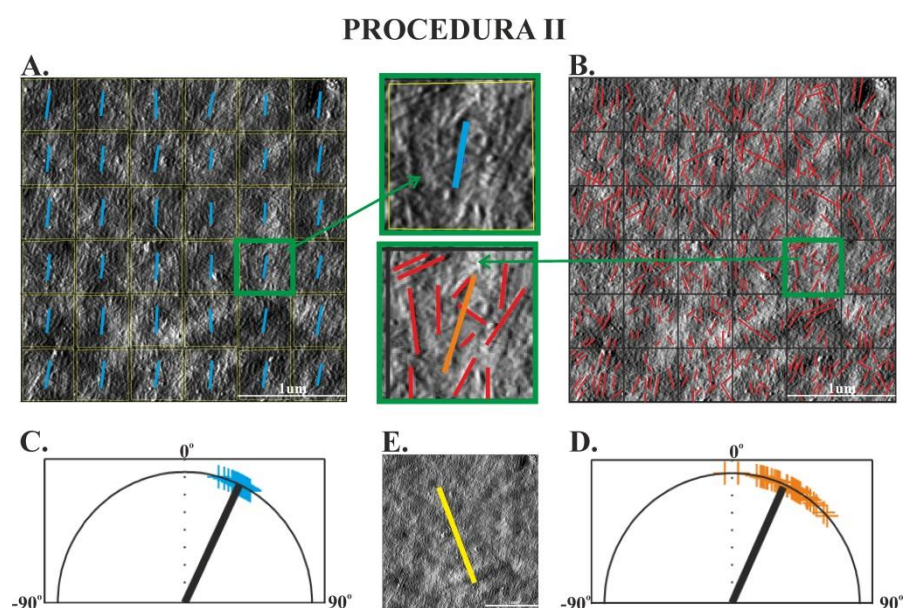
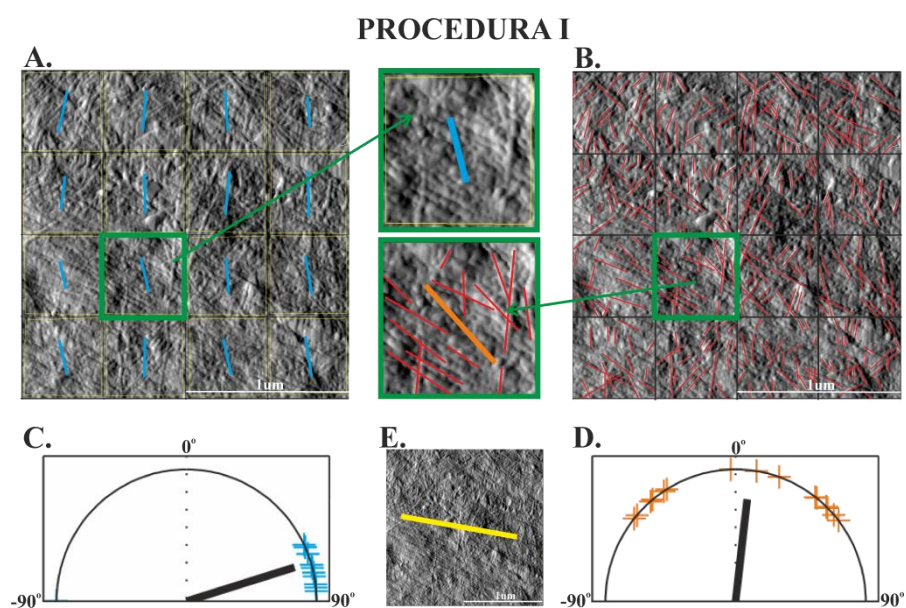
- 6 fragmentów ścian z próbek przygotowanych według procedury I (traktowanie ACE),
- 5 dla procedury II (traktowanie NaOH),
- 4 dla procedury III (traktowanie ACE oraz NaOH),
- 3 dla procedury IV (plazmoliza).

Plazmolizę prowadzono w celu odsłonięcia wewnętrznej powierzchni ściany w wyniku kurczenia protoplastu. Traktowanie komórek nieplazmolizowanych ACE i/lub NaOH miało na celu usunięcie elementów matriks oraz resztek protoplastu (Broda 1971), które mogłyby zasłaniać wewnętrzną powierzchnię ściany.

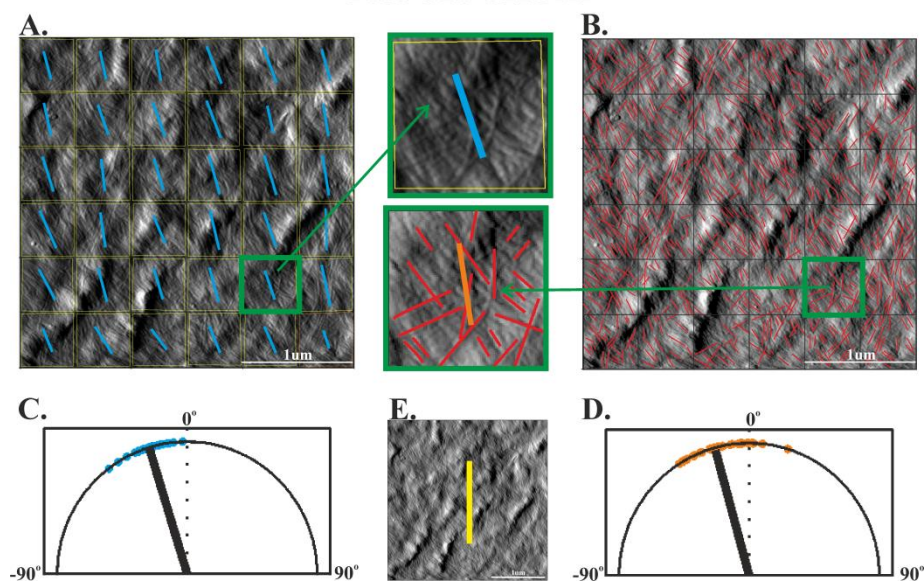
Niezależnie od zastosowanej procedury na obrazach wewnętrznej powierzchni ściany peryklinalnej uzyskanych w AFM widoczne były zarówno fibryle leżące w powierzchniowej lameli ściany, jak i leżące pod nimi fibryle lameli podpowierzchniowej, które często były inaczej zorientowane (patrz powiększone kwadraty na Ryc.IV.4.1). Widoczny układ fibryl miał więc charakter polilamelarny.

Wstępna analiza obrazów fragmentów ściany uzyskanych w AFM pokazała, że układ fibryl celulozowych na powierzchni badanych fragmentów nie jest jednorodny. By oszacować

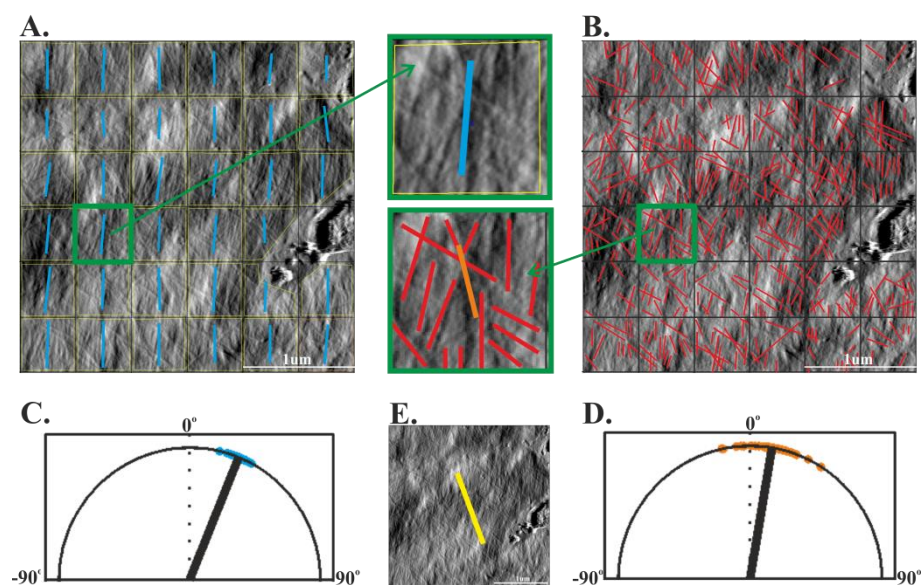
to zróżnicowanie obrazy dzielono na kwadraty o boku $0,5\ \mu\text{m}$ i dla każdego z nich określano średni kąt nachylenia fibryl względem długiej osi komórki oraz stopień uporządkowania układu fibryl, wykorzystując dwie metody: narzędzie ImageJ FibrilTool (Boudaoud i in. 2014) oraz metodę ręcznej digitalizacji, po której prowadzono analizę statystyczną danych kierunkowych (Berens 2009). Niezależnie od metody, analiza układu fibryl pokazała, że średni kąt nachylenia fibryl względem osi komórki jest różny dla poszczególnych kwadratów danego obrazu AFM (Ryc.IV.4.2).



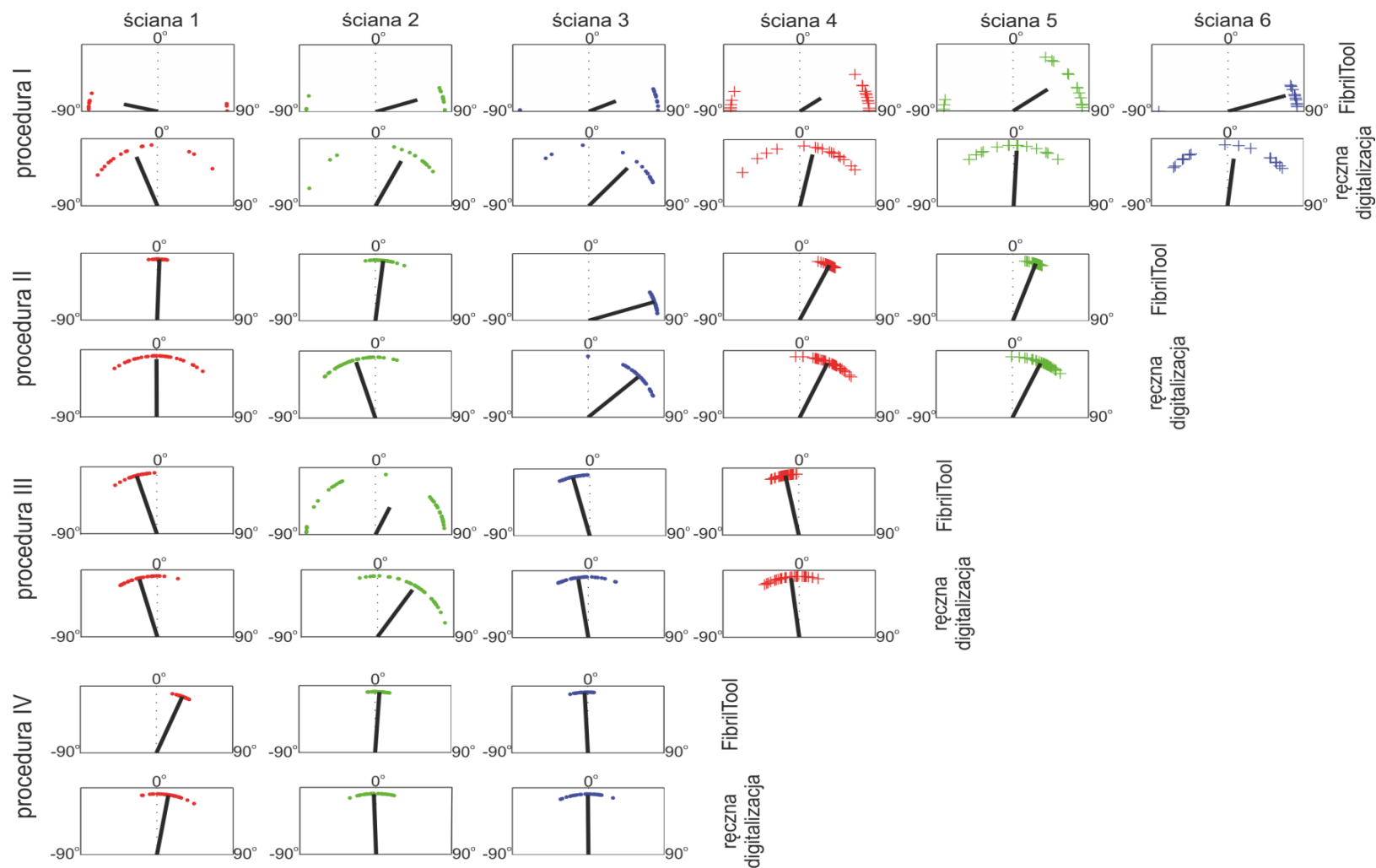
PROCEDURA III



PROCEDURA IV

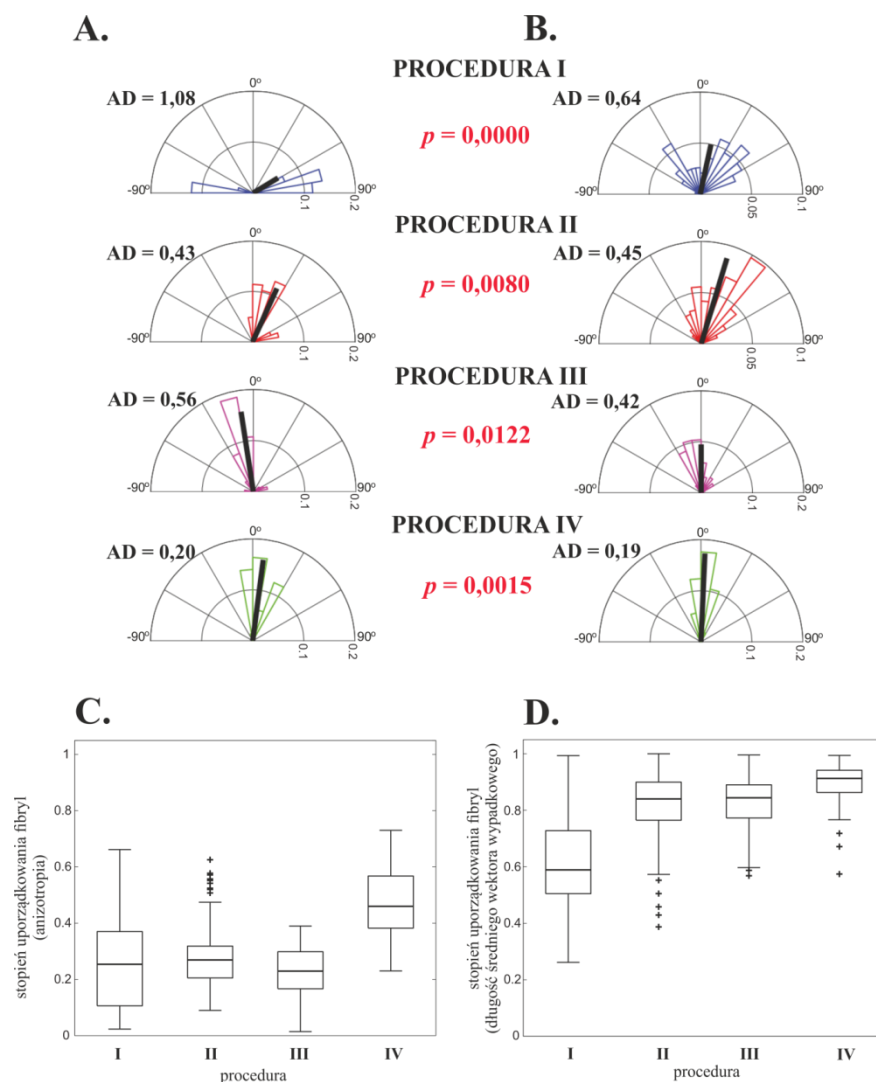


Ryc.IV.4.1. Układ fibryl celulozowych na przykładowych fragmentach ścian, wybranych spośród próbek przygotowanych według różnych procedur (I-IV). Dla każdej procedury przedstawiono wyniki analizy za pomocą narzędzia FibrilTool (A i C), gdzie niebieskie odcinki naniesione na obraz AFM wskazują uśrednioną orientację fibryl, oraz metodą ręcznej digitalizacji (B i D), gdzie czerwonymi odcinkami zaznaczono rozpoznane fibryle, a pomarańczowymi średnią orientację fibryl dla wybranego kwadratu (B - powiększony obraz). Na wykresach polarnych kropki lub krzyże reprezentują średnie kąty nachylenia fibryl określone dla poszczególnych kwadratów z danego obrazu AFM. Czarne odcinki to średnie wektory wypadkowe, jak na Ryc.IV.3.3. Żółtymi odcinkami (E) wskazano orientację długiej osi komórki, względem której określano kąt nachylenia fibryl.



Ryc.IV.4.2. Kąty nachylenia fibryl względem długiej osi komórki wyznaczone dwiema metodami (FibrilTool lub ręcznej digitalizacji) dla wszystkich analizowanych fragmentów ścian z próbek przygotowanych według różnych procedur. Na wykresach polarnych kropki lub krzyże reprezentują średnie kąty nachylenia fibryl określone dla poszczególnych kwadratów z danego obrazu AFM. Czarne odcinki to średnie wektory wypadkowe, jak na Ryc.IV.3.3.

Ze względu na różnice pomiędzy zastosowanymi metodami obliczania średniego kąta nachylenia fibryl oraz stopnia uporządkowania układu fibryl w poszczególnych kwadratach danego obrazu AFM, w wielu przypadkach dla tych samych obrazów AFM uzyskano różne wyniki (na Ryc.IV.4.1 przedstawiono po jednym przykładzie obrazu AFM wraz z pełną analizą dla każdej procedury; wyniki pomiarów dla wszystkich badanych fragmentów ściany przedstawia Ryc.IV.4.2). Narzędzie FibrilTool (Ryc.IV.4.1.A) określa anizotropię układu fibryl na zadanym obszarze (w tym wypadku dla danego kwadratu na obrazie AFM) na podstawie tensora tekstury obrazu. Na wyznaczany w ten sposób średni kąt nachylenia fibryl mają wpływ wszystkie widoczne odcinki fibryl, przy czym im dłuższy odcinek fibryli, tym większy wpływ ma jej kąt nachylenia na kąt średni. Natomiast podczas ręcznej digitalizacji (Ryc.IV.4.1.B) do analizy wybierano tylko dobrze widoczne fibryle, a uśredniając kąt ich nachylenia nie brano pod uwagę długości widocznych odcinków fibryl. Jest to najprawdopodobniej jedna z przyczyn różnic pomiędzy wynikami otrzymanymi z wykorzystaniem FibrilTool (Ryc.IV.4.1.C; Ryc.IV.4.2) oraz metodą ręcznej digitalizacji (Ryc.IV.4.1.D; Ryc.IV.4.2). Największe różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi tymi dwiema metodami stwierdzono w przypadku procedury I (próbki traktowane ACE). Może to być spowodowane tym, że po zastosowaniu tej procedury odsłonięte fibryle w lameli podpowierzchniowej były wyraźniejsze niż po zastosowaniu pozostałych procedur (II-IV). Dlatego w przypadku procedur II-IV orientacja fibryl leżących w podpowierzchniowej lameli ściany w mniejszym stopniu wpływała na wyniki pomiarów wykonanych za pomocą FibrilTool. Niemniej jednak dla próbek przygotowanych według wszystkich procedur stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy średnimi kątami nachylenia fibryl wyznaczonymi za pomocą FibrilTool i ręcznej digitalizacji (wartości p dla porównania średnich podano na Ryc.IV.4.3.A i B).



Ryc.IV.4.3. Histogramy kątowe prezentują zmiennność średniego kąta nachylenia fibryl celulozowych w kwadracie, określanego z wykorzystaniem narzędzia FibrilTool (**A**) lub metodą ręcznej digitalizacji (**B**). W każdym histogramie uwzględniono średnie kąty dla wszystkich kwadratów wyznaczonych na obrazach AFM ścian przygotowanych zgodnie z daną procedurą. Wykresy pudełkowe prezentują stopień uporządkowania fibryl w poszczególnych kwadratach, wyznaczony jako anizotropia przez narzędzie FibrilTool (**C**) lub długość średniego wektora wypadkowego dla wyników ręcznej digitalizacji (**D**). Histogramy kątowe przygotowano jak na Ryc. IV.3.3. Wartości p (test Watsona-Williamsa) określają, czy różnice pomiędzy wynikami otrzymanymi z wykorzystaniem narzędzia FibrilTool (**A**) oraz metodą ręcznej digitalizacji (**B**) są istotne statystycznie (kolorem czerwonym zaznaczono wartości p wskazujące na różnice istotne dla $P < 0,05$). Na wykresach (**C** i **D**) „pudełka” wskazują na zakresy wartości obejmujące 2. i 3. kwartył, czarna linia wewnątrz każdego pudełka to mediana, „wąsy” rozciągające się od krawędzi każdego pudełka wskazują wartości maksymalne, które mieszczą się w przedziale 1,5 krotności rozstępu kwartalnego, natomiast krzyże to wartości skrajne, nie mieszczące się w tym przedziale. Im większa wartość anizotropii (**C**) lub długość średniego wektora wypadkowego (**D**), tym większe uporządkowanie fibryl.

Układy fibryl na powierzchni ścian próbek przygotowanych według poszczególnych procedur różniły się **zmiennością średniego kąta nachylenia fibryl w kwadratach, określoną przez odchylenie katowe** (AD na Ryc.IV.4.3.A i B). Najmniejsze zróżnicowanie wyników pomiarów (najniższe odchylenie katowe) zaobserwowano dla próbek przygotowanych według procedury IV. W przypadku tej procedury próbki nie były traktowane chemicznie, ale tylko plazmolizowane, więc fibryle leżące w podpowierzchniowej lameli ściany były najslabiej widoczne a ich orientacja w najmniejszym stopniu wpływała na średni kąt nachylenia. Największe zróżnicowanie wyników pomiarów (najwyższe odchylenie katowe) zaobserwowano natomiast dla próbek z procedury I, które jak już wcześniej wspomniano, miały wyraźne fibryle lameli podpowierzchniowej. Należy jednak pamiętać, że wartość odchylenia katowego (AD) dla FibrilTool (Ryc.IV.4.3.A) dla procedury I jest nieco zawyżona, ponieważ w obliczeniach nie jest brane pod uwagę, że zarówno kąty nachylenia bliskie 90° , jak kąty około -90° określają poprzeczny układ fibryl.

Zastosowane metody pozwoliły także **oszacować stopień uporządkowania układu fibryl w poszczególnych kwadratach**, na które podzielono obrazy AFM (Ryc.IV.4.3.C, D), choć w metodach tych współczynniki określające uporządkowanie fibryl były obliczane w różny sposób. Ręczna digitalizacja pokazała, że fibryle są w najmniejszym stopniu uporządkowane na próbkach przygotowanych według procedury I (Ryc.IV.4.3.D). Natomiast pomiary FibrilTool pokazały, że stopień uporządkowania fibryl na powierzchni próbek plazmolizowanych (procedura IV) był wyraźnie wyższy niż pozostałych (Ryc.IV.4.3.C). Również te wyniki można tłumaczyć wspomnianymi powyżej różnicami w wyrazistości fibryl lameli podpowierzchniowej.

Średnie kąty nachylenia fibryl w próbkach przygotowanych według różnych procedur zwykle różniły się pomiędzy sobą istotnie statystycznie (Tabela IV.4.1.). Trudno jednak rozstrzygnąć, w jakim stopniu różnice te wynikają z różnych procedur przygotowania próbek, a w jakim stopniu z rzeczywistych różnic pomiędzy układem fibryl w poszczególnych próbkach, w skład których wchodziły fragmenty ścian pochodzące z różnych komórek.

Podsumowując, niezależnie od procedury przygotowania próbki wyniki analizy układu fibryl na wewnętrznej powierzchni ściany komórkowej uzyskane obiema metodami wskazały na pewne tendencje: (i) widoczny układ fibryl ma charakter polilamelarny; (ii) średnie kąty nachylenia fibryl względem osi komórki są różne dla ścian poszczególnych komórek; (iii) kąty nachylenia fibryl względem osi komórki są różne dla poszczególnych kwadratów danego obrazu AFM, czyli kąt ten jest zróżnicowany także w skali subkomórkowej; (iv) fibryle lameli podpowierzchniowej są najmniej wyraźne dla próbek

przygotowanych według procedury IV, czyli plazmolizowanych, a najwyraźniejsze dla procedury I, czyli próbek traktowanych ACE.

procedura	I (ACE)	II (NaOH)	III (ACE + NaOH)	IV (plazmoliza)
I (ACE)	—	FibrilTool: <i>p = 0,000001</i>	FibrilTool: <i>p = 0,000000</i>	FibrilTool: <i>p = 0,000000</i>
II (NaOH)	ręczna digitalizacja: <i>p = 0,258672</i>	—	FibrilTool: <i>p = 0,000000</i>	FibrilTool: <i>p = 0,000000</i>
III (ACE + NaOH)	ręczna digitalizacja: <i>p = 0,002878</i>	ręczna digitalizacja: <i>p = 0,000000</i>	—	FibrilTool: <i>p = 0,000001</i>
IV (plazmoliza)	ręczna digitalizacja: <i>p = 0,014232</i>	ręczna digitalizacja: <i>p = 0,000000</i>	ręczna digitalizacja: <i>p = 0,271091</i>	—

Tabela.IV.4.1. Wyniki testu Watsona-Williamsa sprawdzającego istotność różnic średnich kątów nachylenia fibryl pomiędzy próbkami przygotowanymi zgodnie z różnymi procedurami, osobno dla wyników otrzymanych z wykorzystaniem narzędzia FibrilTool oraz metodą ręcznej digitalizacji. Czerwonym kolorem zaznaczono wartości *p* wskazujące na różnice istotne statystycznie dla $P < 0,05$.

IV.5. Układ fibryl celulozowych na całej grubości zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek epidermy.

Kąt nachylenia względem długiej osi komórki określano również dla fibryl celulozowych znajdujących się na całej grubości ściany (*Microfibril Angle* – MFA), wykorzystując mikroskop polaryzacyjny. Pomiar MFA możliwy był w dowolnie wybranym regionie ściany: nie tylko w części równowąskiej komórek, ale również przy ich końcach. Do badań wykorzystywano preparaty z wyizolowaną zewnętrzną ścianą peryklinalną, które przygotowywano zgodnie z procedurą IV opisaną dla próbek badanych w AFM (patrz Aneks; An.1 oraz Materiał i metody; III.2.1), modyfikując jedynie stężenie roztworu plazmolizującego oraz czas plazmolizy.

Analizowano ściany 30 komórek pochodzących z cebul młodych oraz 30 komórek pochodzących z cebul dojrzałych. W każdej z tych ścian wykonywano pomiar MFA dla jednego, wybranego regionu ściany w części równowąskiej komórki oraz jednego regionu przy każdym końcu komórki. Ponieważ końce analizowanych komórek różniły się pod względem kształtu, podzielono je na trzy kategorie (Ryc.III.4.1.A-C), takie same jak w trakcie analizy układu prążków widocznych w mikroskopie Nomarskiego (rozdział IV.1).

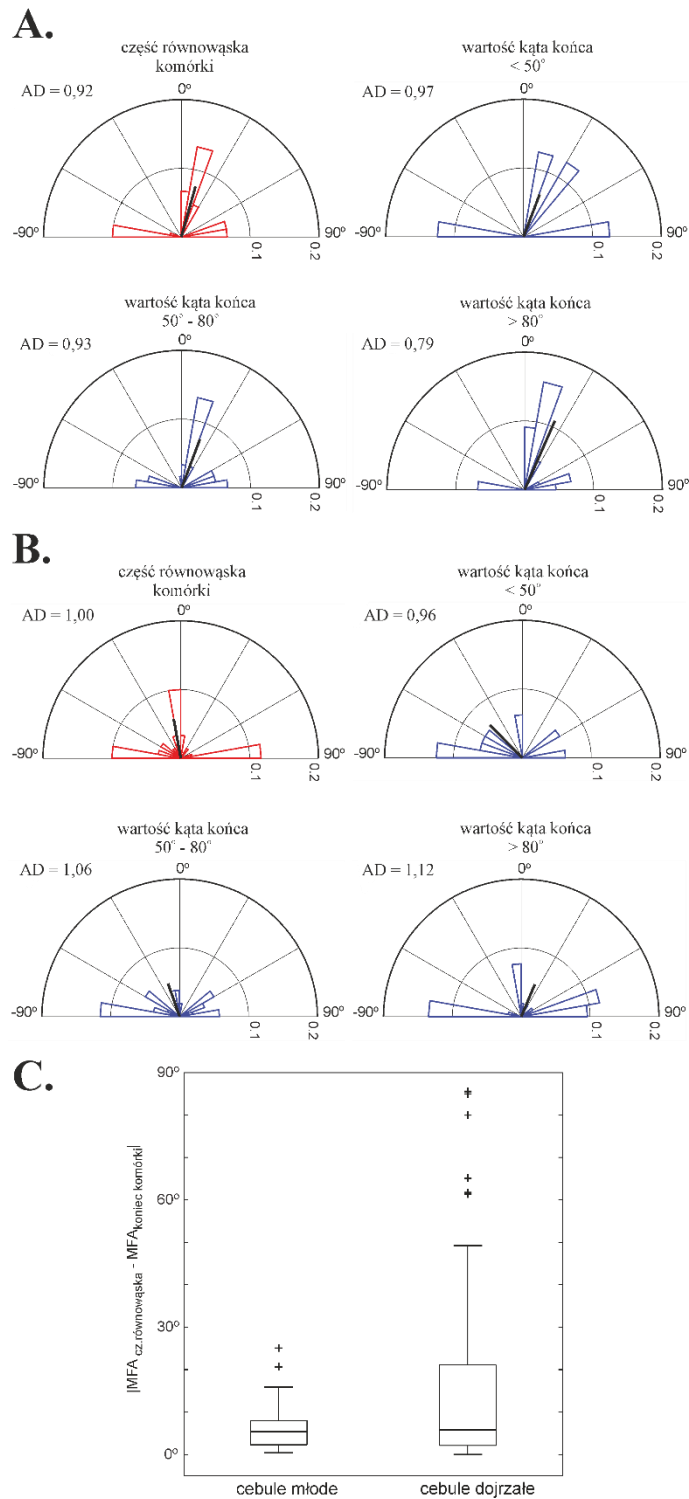
MFA zmierzono dla:

- 60 regionów w części równowąskiej komórek z cebul młodych (30 regionów) i dojrzałych (30)
- 16 bardzo ostrych końców komórek z cebul młodych (8) oraz dojrzałych (8)
- 56 ostrych końców komórek z cebul młodych (30) oraz dojrzałych (26)
- 48 tępych końców komórek z cebul młodych (22) oraz dojrzałych (26)

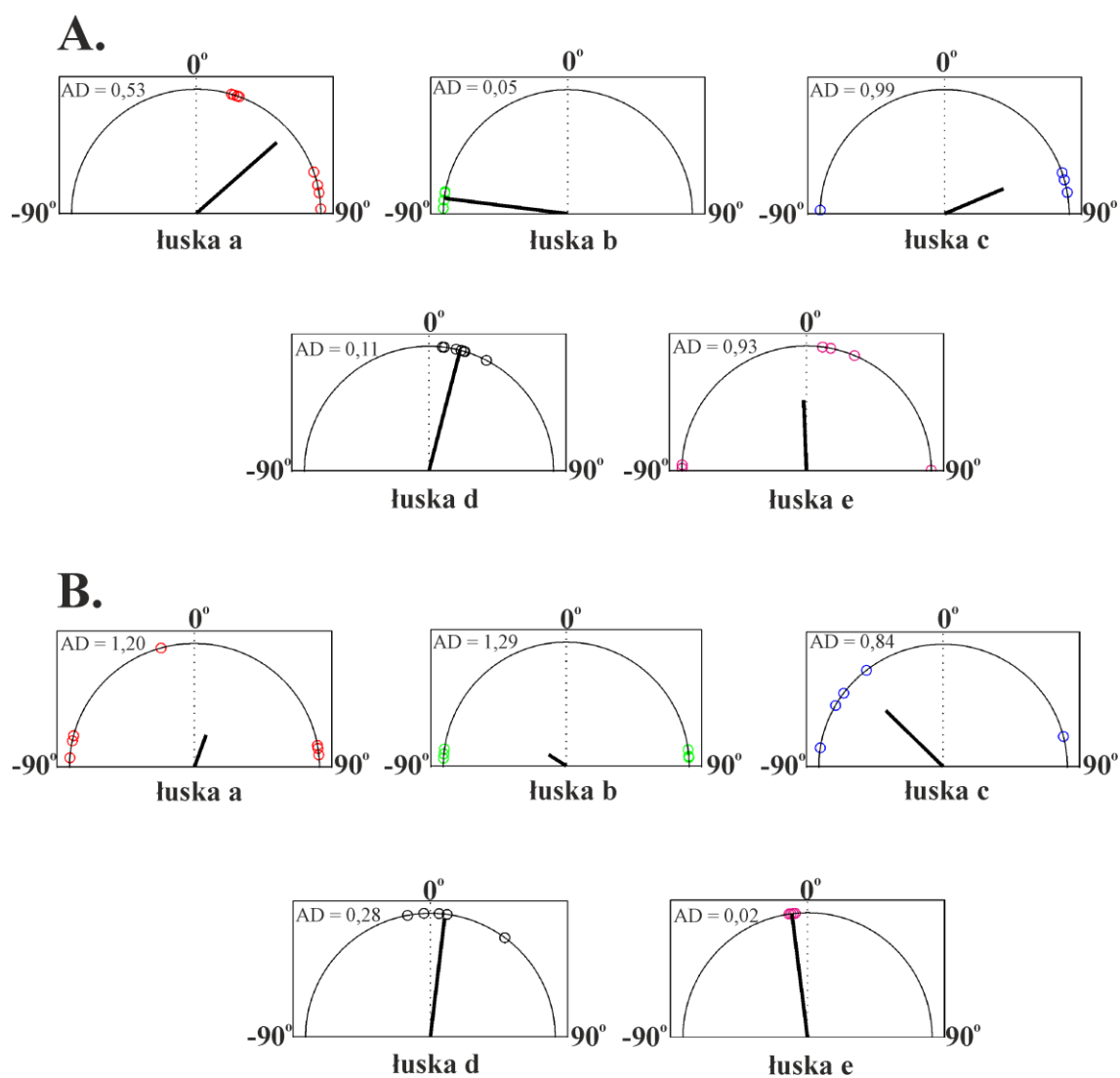
MFA ścian w części równowąskiej oraz przy tępych końcach komórek epidermy cebul młodych i dojrzałych był podobny (Ryc.IV.5.1.A, B). W obu przypadkach dominowały fibryle zorientowane prawie poprzecznie (wartość MFA bliska -90° lub 90°) i w nieco mniejszym stopniu – prawie podłużnie (wartość MFA bliska 0°). Takim bimodalnym rozkładom towarzyszyły wysokie wartości odchylenia kąтового (AD na Ryc.IV.5.1.A, B). Podobne bimodalne rozkłady obserwowano w pozostałych (ostrzych i bardzo ostrzych) końcach komórek z cebul młodych (Ryc.IV.5.1.A). Natomiast dla cebul dojrzałych przy takich końcach komórek pojawiała się częściej skośne ułożenie fibryl (Ryc.IV.5.1.B).

Ze względu na takie zróżnicowanie MFA, w następnej kolejności porównano MFA na każdym z końców komórki z MFA w jej części równowąskiej. Bezwzględna wartość różnic pomiędzy MFA końca i części równowąskiej ściany w komórkach z cebul dojrzałych była często większa niż młodych (Ryc.IV.5.1.C), ale w obu przypadkach większość różnic była bliska zeru, co wskazuje, że układ fibryl jest zbliżony na całej powierzchni ściany.

W kolejnym etapie badań sprawdzono, czy występowanie dwóch dominujących wartości MFA na histogramach, na których zestawiono wszystkie pomiary, nie odzwierciedla różnic w układzie fibryl pomiędzy poszczególnymi łuskami. W tym celu porównano MFA części równowąskiej komórek pochodzących z różnych łusek (Ryc.IV.5.2). Zarówno w przypadku komórek pochodzących z cebul młodych (Ryc.IV.5.2.A) jak i dojrzałych (Ryc.IV.5.2.B) stwierdzono, że w 3/5 łusek MFA przyjmowało tylko jedną z dwóch wartości (bliską 0° lub $90^\circ/-90^\circ$) a w pozostałych łuskach reprezentowane były obie orientacje fibryl. Zatem występowanie dwóch dominujących wartości MFA na zbiorczych histogramach (Ryc.IV.5.1.) po części tłumaczyć można tym, że badane komórki epidermy pochodziły z różnych łusek.



Ryc.IV.5.1. MFA mierzone za pomocą mikroskopu polaryzacyjnego dla wszystkich analizowanych regionów ściany w części równowąskiej i na końcach bardzo ostrych (kąt końca $< 50^\circ$), ostrych (kąt końca $50^\circ - 80^\circ$) oraz tępach (kąt końca $> 80^\circ$) komórek pochodzących z cebul młodych (**A**) i dojrzałych (**B**). Histogramy kątowe przygotowano jak na Ryc. IV.3.3. Wykresy pudełkowe (**C**) przedstawiające wartości bezwzględne różnic pomiędzy MFA końca a części równowąskiej komórek, przygotowano jak na Ryc.IV.4.3.



Ryc.IV.5.2. MFA części równowąskiej komórek pochodzących z poszczególnych łusek cebul młodych (**A**) i dojrzałych (**B**). Na wykresach polarnych każda kropka oznacza jeden pomiar ułożenia fibryli. Wykresy polarne przygotowano jak na Ryc.IV.4.1.

V. Dyskusja.

V.1. Jodek propidyny jako znacznik jąder martwych komórek.

W trakcie prezentowanych w niniejszej pracy badań, prowadzonych z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego, zastosowano barwienie jodkiem propidyny (PI), które miało na celu wybarwienie ścian komórkowych oraz umożliwienie identyfikacji martwych komórek. Zgodnie z danymi literaturowymi PI może bowiem wnikać do komórek, które mają uszkodzoną błonę komórkową, gdzie następnie łączy się z jądrowym DNA i powoduje fluorescencję jądra (Rounds i in. 2011). W związku z tym zabarwienie jądra PI powinno świadczyć o śmierci komórki (Hamant i in. 2014). Jednak w trakcie analizy odkształcenia objętościowego prezentowanej w niniejszej pracy stwierdzono, że duża część komórek o jądrach zabarwionych PI, które zgodnie z literaturą powinny być uznane za martwe, odkształcała się w sposób typowy dla komórek żywych, czyli ich objętość zmniejszała się po plazmolizie a zwiększała po deplazmolizie. To sugeruje, że zabarwienie jądra PI nie zawsze jest wyznacznikiem śmierci komórki. Być może PI wnika również do komórek, w których na skutek traktowania osmotycznego dochodzi do permeabilizacji (zwiększenia przepuszczalności) błony komórkowej poprzez jej reorganizację. Takie komórki mogą pozostawać żywe mimo obecności PI w jądrze, a w związku z tym odkształcać się w sposób podobny do innych żywych komórek.

Reorganizację błony komórkowej, zachodzącą na skutek stresu i prowadzącą do zmian w przepuszczalności błony, zaobserwowano w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Dupont i in. 2010; Davey, Hexley 2011; da Silva Pedrini i in. 2014). Dupont i współpracownicy (2010) badali reorganizację błony komórkowej towarzyszącą dehydratacji komórek drożdży. Przeżywalność komórek drożdży jest znacznie większa, gdy proces dehydratacji przez umieszczenie w roztworze hipertonicznym o stężeniu dobranym tak, aby zahamowany był proces endocytozy, przeprowadzany jest stopniowo, niż gdy przebiega on gwałtownie. Tempo dehydratacji wpływa bowiem na sposób reorganizacji błony komórkowej. Powolna dehydratacja powoduje powstawanie zakładek (pofałdowań) błony komórkowej lub pęcherzyków zlokalizowanych w pobliżu błony, które prawdopodobnie podczas ponownej rehydratacji (przez umieszczenie w roztworze izotonicznym) umożliwiają przywrócenie błony do stanu wyjściowego, a w związku z tym przeżycie komórki. Zaś gwałtowna dehydratacja skutkuje silnym pofałdowaniem błony, z fałdami wchodzącymi głęboko do cytoplazmy, oraz internalizacją błony, która w formie pęcherzyków dostaje się głęboko do wnętrza komórki. Prawdopodobnie komórki, które pozostały żywe po gwałtownej dehydratacji, ze względu na zmniejszenie powierzchni błony nie mają możliwości jej

odtworzenia podczas ponownej rehydratacji, a w związku z tym dochodzi do lizy tych komórek. Eksperyment z wykorzystaniem PI wykazał, że zarówno w trakcie dehydratacji jak i rehydratacji zwiększa się przepuszczalność błony komórek drożdży, przy czym była ona większa, gdy procesy te przeprowadzano gwałtownie. Warto podkreślić, że także podczas stopniowej rehydratacji przepuszczalność błony komórkowej była wysoka (Dupont i in. 2010). Przejściowa permeabilizacja błony komórkowej i wnikanie PI do żywych komórek drożdży mogą też być następstwem narażenia komórek na chemiczne lub fizyczne czynniki stresowe, jak ekspozycja na 30% etanol, 0,06% SDS, albo temperaturę 50°C (Davey, Hexley 2011). Co ciekawe, PI stwierdzono w jądrach większej liczby komórek wtedy, gdy poddawane one były stresowi w obecności PI, natomiast w mniejszej liczbie komórek wtedy, gdy komórki inkubowano w PI dopiero po poddaniu ich stresowi. Świadczy to o tym, że permeabilizacja błony jest krótkotrwała. Podobnie, barwienie PI suchych drożdży piekarniczych, które poddano procesowi rehydratacji, wykazało, że w początkowych etapach rehydratacji procentowy udział komórek o zabarwionych jądrach był dużo większy niż po 60 lub 90 minutach. Oznacza to, że w trakcie rehydratacji przepuszczalność błony komórkowej dla PI stopniowo zmniejszała się (Davey, Hexley 2011). Potwierdzeniem takiej tymczasowej permeabilizacji błony komórkowej podczas rehydratacji są również wyniki eksperymentów, w których badano przenikanie do cytoplazmy FITC-Dextranu, barwnika fluorescencyjnego, który w normalnych warunkach nie jest w stanie przeniknąć przez błonę komórkową (da Silva Pedrini i in. 2014). W komórkach drożdży, które wcześniej umieszczono w roztworze hipertonicznym, już w pierwszej minucie rehydratacji w obecności FITC-Dextranu stwierdzono obecność barwnika w cytoplazmie. Obecność FITC-Dextranu stwierdzono również w wakuolach komórek drożdży, które przez cały czas eksperymentu utrzymywano w warunkach izotonicznych. Jednakże w cytoplazmie tych komórek zaobserwowano również fragmenty błony komórkowej wskazujące, że w tym przypadku wnikanie FITC-Dextranu zachodziło na drodze endocytozy. Takich fragmentów błony komórkowej nie zaobserwowano w cytoplazmie komórek drożdży, które traktowano osmotycznie (da Silva Pedrini i in. 2014).

Z omówionych powyżej badań wynika, że na skutek traktowania osmotycznego błona komórkowa drożdży ulega tymczasowej permeabilizacji, która umożliwia wniknięcie do wnętrza komórek barwników, takich jak PI i FITC-Dextran, które w normalnych warunkach nie przenikają przez błonę komórkową. Być może również błona komórkowa komórek epidermy cebuli poddawanych plazmolizie i deplazmolizie ulega krótkotrwałej permeabilizacji, której efektem jest barwienie jąder żywych komórek PI. Badania opisane

w niniejszej pracy pokazują, że najwięcej komórek o jądrach zabarwionych PI, a odkształcających się w sposób typowy dla komórek żywych, występuje w wariantach doświadczenia, w których wykorzystano epidermę młodych cebul (wariant II i IV). W wariantach, w których wykorzystano epidermę dojrzałych cebul (I i III), udział komórek o jądrach zabarwionych PI był dużo mniejszy. Można więc przypuszczać, że komórki pochodzące z cebul dojrzałych są mniej podatne na permeabilizację błony komórkowej, zachodzącą na skutek traktowania osmotycznego, niż komórki pochodzące z cebul młodych.

Warto podkreślić, że w komórkach drożdży traktowanych osmotycznie, w odróżnieniu od komórek roślinnych, ściana komórkowa przez cały czas pozostaje w kontakcie z błoną. Oznacza to, że w trakcie dehydratacji w podobnym stopniu kurczy się zarówno błona, jak i ściana komórkowa (Dupont i in. 2010; Morris i in. 1986), podobnie jak w trakcie cytoryzy komórek roślinnych. W komórkach roślinnych natomiast traktowanie roztworem hipertonicznym prowadzące do plazmolizy powoduje, że z błony komórkowej wytwarzane są nici Hechta, które łączą błonę ze ścianą. Podczas deplazmolizy dochodzi zaś do fuzji błony komórkowej z nićmi Hechta (Lang-Pauluzzi 2000). Mechanizm reorganizacji błony komórkowej w trakcie traktowania osmotycznego różni się więc w komórkach drożdży i roślin. Jednak prezentowane w niniejszej pracy badania pokazują, że w obu grupach organizmów traktowanie osmotyczne może zwiększać przepuszczalność błony komórkowej.

V.2. Zmiany ciśnienia osmotycznego a wnikanie PI do komórek epidermy łusek cebuli.

We wszystkich przeprowadzonych w niniejszej pracy wariantach eksperymentu (warianty I-IV) komórki epidermy cebuli traktowano osmotycznie w sposób nagły, ale stosując niewielkie stężenie roztworu plazmolizującego (2,5% NaCl). Z badań na komórkach drożdży wiadomo, że nagłe poddanie komórek czynnikowi wywołującemu stres nie jest letalne, jeśli stres ten jest stosunkowo słaby (Dupont i in. 2010). Ponieważ 2,5% NaCl wywołuje plazmolizę wklęsłą komórek epidermy cebuli, można przypuszczać, że stres jest na tyle słaby, że przynajmniej część komórek o jądrach zabarwionych PI pozostaje żywa. Przemawia za tym dodatkowo fakt, że znaczna część komórek o jądrach zabarwionych PI ulegała deplazmolizie. Ponadto z badań innych autorów wiadomo, że traktowanie komórek epidermy cebuli dużo większymi stężeniami roztworów plazmolizujących, jak 40% roztwór sacharozy, maltozy, czy trehalozy, nie było dla tych komórek letalne (Ferrando, Spiess 2001).

Eksperymenty prowadzone na epidermie łusek młodych cebul pokazały, że na wnikanie PI do komórek prawdopodobnie wpływa wielkość zmiany ciśnienia osmotycznego roztworu. W przypadku gdy komórki inkubowano kolejno: w roztworze izotonicznym

(zawierającym PI), hipertonicznym wywołującym plazmolizę, hipotonicznym wywołującym deplazmolizę (wariant IV), obecność PI w jądrach komórkowych obserwowano dopiero po deplazmolizie. Można więc przypuszczać, że w komórkach doszło do tymczasowej permeabilizacji błony dopiero na skutek większej zmiany ciśnienia osmotycznego roztworu (bezwzględna zmiana ciśnienia była większa przy przeniesieniu komórek z roztworu hiper- do hipotonicznego niż z roztworu izo- do hipertonicznego). Wnikający do komórek PI prawdopodobnie pochodził ze ściany komórkowej. Jeśli zaś komórki inkubowano kolejno: w roztworze hipotonicznym (zawierającym PI), hipertonicznym, hipotonicznym (wariant II), obecność PI w jądrach stwierdzono w komórkach już po plazmolizie. W tym wypadku znaczna zmiana ciśnienia osmotycznego (z hipo- do hipertonicznego) miała miejsce już w trakcie plazmolizy. Natomiast sama inkubacja w roztworze hipotonicznym (PI w wodzie) nie była dla komórek stresem prowadzącym do zmian w przepuszczalności błony.

V.3. Odształcenie objętościowe komórek epidermy cebuli wywołane traktowaniem osmotycznym.

Zmniejszeniu oraz zwiększeniu ciśnienia turgorowego w komórce towarzyszy odpowiednio zmniejszenie oraz zwiększenie jej objętości (Steudle, Zimmermann 1977; Weber i in. 2015). W trakcie plazmolizy komórka oddaje wodę na zewnątrz, co powoduje zmniejszenie turgoru, natomiast w trakcie deplazmolizy pobiera wodę z otoczenia, co z kolei powoduje zwiększenie turgoru. Zatem zgodnie z oczekiwaniami plazmolizie powinno towarzyszyć zmniejszenie, a deplazmolizie zwiększenie objętości komórek. Takie odkształcenia stwierdzono dla większości komórek żywych, o jądrach niezabarwionych PI, oraz dla części komórek, które najprawdopodobniej pozostawały żywe, choć PI wybarwiło ich jądra na skutek tymczasowej permeabilizacji błony.

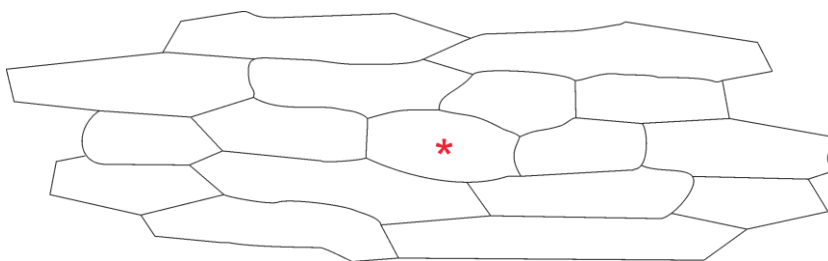
Porównanie odkształceń objętościowych, towarzyszących plazmolizie oraz deplazmolizie, komórek pochodzących z cebul młodych i dojrzałych, które inkubowano przed plazmolizą w roztworze hipotonicznym lub izotonicznym zawierającym PI (warianty I-IV) najczęściej nie wykazywało różnic istotnych statystycznie, co można tłumaczyć dużą zmiennością odkształceń w obrębie każdego wariantu. Warto jednak zwrócić uwagę, że odkształcenia objętościowe, towarzyszące zarówno plazmolizie jak i deplazmolizie, dużej grupy komórek z cebul młodych, które inkubowano przed plazmolizą w roztworze hipotonicznym zawierającym PI (wariant II), były większe niż w przypadku komórek młodych, które inkubowano przed plazmolizą w roztworze izotonicznym zawierającym PI (wariant IV), oraz komórek pochodzących z cebul dojrzałych (wariant I i III). Wśród komórek

epidermy cebul dojrzałych, które przed plazmolizą inkubowano w roztworze izotonicznym zawierającym PI (wariant III), zaobserwowano zaś dużą grupę komórek, w której odkształcenia towarzyszące plazmolizie oraz deplazmolizie były mniejsze niż w przypadku komórek inkubowanych przed plazmolizą w roztworze hipotonicznym zawierającym PI (wariant I) oraz komórek epidermy cebul młodych (wariant II i IV). Porównanie to sugeruje, że odkształcenie objętościowe komórek towarzyszące traktowaniu osmotycznemu jest większe dla komórek o cieńszej i bardziej elastycznej ścianie – ściany komórek epidermy cebul młodych są najprawdopodobniej cieńsze i bardziej elastyczne niż ściany komórek z cebul dojrzałych. Podobnie odkształcenia powierzchniowe zewnętrznej ściany peryklinalnej, towarzyszące zmianie roztworu hipotonicznego na hipertoniczny, są większe w komórkach merystemu apikalnego pędu pomidora o cienkich i elastycznych ścianach (Kierzkowski i in. 2012) niż w komórkach adaksjalnej epidermy dojrzałej cebuli o grubszych i mniej elastycznych ścianach (Natonik-Białoń i in. 2020; patrz Aneks An.4). Ponadto, jak już wcześniej wspomniano, większej bezwzględnej zmiany ciśnienia osmotycznego w komórce towarzyszy większe odkształcenie objętościowe. Większe odkształcenia towarzyszące plazmolizie obserwowano bowiem w komórkach epidermy, które przed plazmolizą inkubowano w roztworze hipotonicznym (w którym rozpuszczano PI). Podobne wyniki uzyskano dla komórek tytoniu BY-2, których odkształcenie (kurczenie w kierunku podłużnym) towarzyszące plazmolizie (0,55M mannitol) jest większe, jeśli przed plazmolizą komórki inkubowano w wodzie (roztwór hipotoniczny), niż jeśli inkubowano je w roztworze izotonicznym (0,2M mannitol) (Weber i in. 2015). Również w przypadku zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek merystemu apikalnego pędu pomidora większe odkształcenia powierzchniowe towarzyszyły zmianie roztworu hipotonicznego na hipertoniczny niż izotonicznego na hipertoniczny (Kierzkowski i in. 2012).

Wielkość bezwzględnej zmiany ciśnienia osmotycznego w komórce w trakcie plazmolizy wydaje się mieć wpływ na odkształcenie towarzyszące deplazmolizie. Jak opisano powyżej, największe odkształcenia objętościowe towarzyszyły deplazmolizie komórek epidermy cebul młodych, które przed plazmolizą inkubowano w roztworze hipotonicznym zawierającym PI (wariant II). Warto podkreślić, że towarzyszące deplazmolizie odkształcenia tych komórek różniły się istotnie statystycznie od komórek w pozostałych wariantach doświadczenia, w tym komórek z cebul młodych, które przed plazmolizą inkubowano w roztworze izotonicznym zawierającym PI (wariant IV). Również w przypadku komórek epidermy cebul dojrzałych zaobserwowano większe odkształcenia objętościowe towarzyszące deplazmolizie komórek, które przed plazmolizą inkubowano w roztworze hipotonicznym

(wariant I) niż izotonicznym (wariant III). Oznacza to, że sposób traktowania komórek przed plazmolizą, a dokładniej wielkość bezwzględnej zmiany ciśnienia osmotycznego w komórce, ma wpływ na odkształcenie towarzyszące deplazmolizie. Może to być efekt analogiczny do opisywanego dla nierosnących komórek *Chara corallina* (Proseus i in. 1999), które po gwałtownym obniżeniu a następnie podwyższeniu ciśnienia turgorowego ulegały odkształceniu elastycznemu oraz wiskoelastycznemu prowadzącemu ostatecznie do zwiększenia rozmiarów komórki (patrz Wstęp, rozdział I.3.2).

Objętość wielu komórek o jądrach zabarwionych PI zwiększała się po plazmolizie i zmniejszała po deplazmolizie, co sugeruje że były to komórki martwe. Takie odkształcenia komórek martwych mogą wynikać z tego, że są one biernie odkształcane przez otaczające je komórki żywe, które aktywnie reagując na traktowanie osmotyczne rozciągają sąsiednie martwe komórki w czasie plazmolizy a w czasie deplazmolizy – ściskają (Ryc.V.3.1). Podobne zachowanie komórek epidermy cebuli zaobserwowano, gdy wybraną komórkę epidermy nakłuto powodując zniesienie ciśnienia turgorowego (Routier-Kierzkowska i in. 2012). Po nakłuciu taka komórka kurczy się nie tylko dlatego, że wypływa z niej sok komórkowy, ale również dlatego, że jest ściskana przez otaczające ją żywe komórki, które zwiększają objętość zajmując nową dostępną przestrzeń.



Ryc.V.3.1. Układ komórek epidermy, który może prowadzić do niezgodnego z oczekiwaniami odkształcenia komórek martwych towarzyszącego plazmolizie oraz deplazmolizie. Czerwona gwiazdka wskazuje komórkę martwą.

Nie można jednak wykluczyć, że część z pomiarów odkształceń objętościowych komórek epidermy, które są niezgodne z oczekiwaniami, może być wynikiem nieprawidłowej segmentacji komórek w programie MorphoGraphX (MGX). PI wybarwiał bowiem również ściany komórek miękiszu, leżącego pod epidermą. W związku z tym podczas automatycznej segmentacji silnie wybarwione fragmenty ścian miękiszu mogły być odczytywane w programie MGX jako część danej komórki epidermy. Ponadto, odległość w osi Z między kolejnymi przekrojami optycznymi zbieranymi w mikroskopie konfokalnym, które

wykorzystywano do analizy, wynosiła od $1.13\mu\text{m}$ do $3\mu\text{m}$ dla różnych próbek. Zaś im większa odległość między skrawkami, tym większe prawdopodobieństwo błędów podczas segmentacji komórek w programie MGX.

V.4. Odształcenie powierzchniowe zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek epidermy cebuli wywołane traktowaniem osmotycznym.

Prezentowane w niniejszej pracy badania pokazują, że towarzyszące plazmolizie oraz deplazmolizie odształcenia powierzchniowe zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek epidermy cebuli są bardzo małe i najprawdopodobniej bliskie błędowi pomiarów. Na przekrojach poprzecznych przez komórki epidermy zaobserwowano jednak, że plazmolizie oraz deplazmolizie towarzyszy odpowiednio zmniejszenie oraz zwiększenie krzywizny zewnętrznej ściany peryklinalnej. Oznacza to, że odształcenia objętościowe komórek mogą zachodzić mimo niewielkich odształceń powierzchniowych tej ściany. Podobne wyniki otrzymano w badaniach teoretycznych przeprowadzonych na modelu pojedynczej warstwy komórek epidermy cebuli opartym na elementach skończonych (FEM). Symulacja zwiększenia ciśnienia turgorowego powodowała bowiem zmniejszenie odległości między ścianami antyklinalnymi oraz równoczesne zwiększenie krzywizny zewnętrznych ścian peryklinalnych (Natonik-Białoń i in. 2020; patrz Aneks An.4). Zatem modyfikacjom ciśnienia turgorowego w komórkach towarzyszą zmiany krzywizny oraz niewielkie odształcenia powierzchniowe zewnętrznej ściany peryklinalnej.

Ponieważ odształcenia powierzchniowe zewnętrznej ściany peryklinalnej towarzyszące plazmolizie oraz deplazmolizie były bliskie błędowi pomiarów, niemożliwe było określenie anizotropii tych odształceń. Dlatego też, by oszacować anizotropię analizowano układ prążków pojawiających się na wewnętrznej powierzchni ściany po zniesieniu naprężeń. Pojawianie się takich prążków opisywano dla epidermy hipokotyla i koleoptyla innych gatunków (Hejnowicz, Borowska-Wykręt 2005; Lipowczan i in. 2018). Jak omówiono szczegółowo we Wstępie (patrz I.3.5), prążki powstają na skutek wyboczenia najmłodszej warstwy ściany komórkowej wynikającego z gradientu odształcenia elastycznego poszczególnych jej warstw, a układ prążków związany jest z anizotropią odształcenia powierzchniowego całej ściany.

Ponieważ epiderma adaksjalna łuski cebuli jest bardzo słabo przyczepiona do leżących pod nią tkanek, w ścianie komórek epidermy występują wyłącznie naprężenia wynikające z turgoru. Dlatego traktowanie osmotyczne prowadzące do plazmolizy komórek epidermy cebuli całkowicie znosi naprężenia w ich ścianach. Prezentowane w niniejszej pracy badania

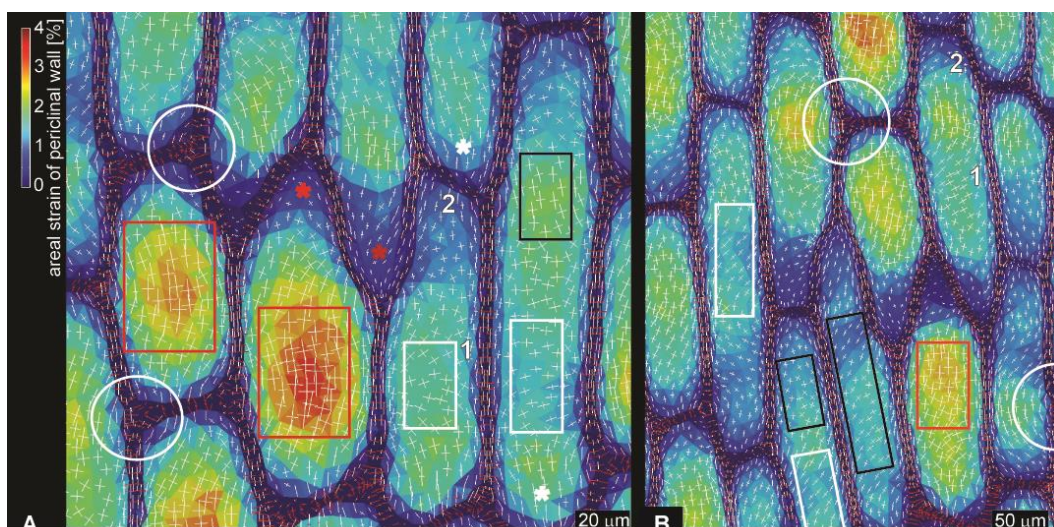
wykazały, że po całkowitym zniesieniu naprężeń w ścianie, na wewnętrznej powierzchni zewnętrznej ściany peryklinalnej pojawiają się prążki podobne do tych obserwowanych w epidermie hipokotyli i koleoptyli. W niniejszej rozprawie przedstawiono analizę układu prążków dla cebul młodych. Analiza układu prążków w cebulach dojrzałych została bowiem przeprowadzona wcześniej (Natonik-Białoń i in. 2020; patrz Aneks An.4). Orientacja prążków w komórkach cebul młodych i dojrzałych była jednak bardzo podobna i w obu przypadkach zależała od lokalizacji w komórce. W części równowąskiej komórki prążki zawsze zorientowane były lekko skośnie lub podłużnie, czyli równolegle do długiej osi komórki. Na końcach tępych orientacja prążków z części równowąskiej przechodziła w charakterystyczny układ fontannowy, zaś na końcach ostrych obserwowano układ poprzeczny, czyli prostopadły do długiej osi komórki (w pracy Natonik-Białoń i in. 2020; patrz Aneks An.4 nazywany obręczowym). W przypadku epidermy pochodzącej zarówno z cebul młodych, jak i dojrzałych, zaobserwowano także występujący lokalnie ponadkomórkowy wzór prążków, czyli lokalną ciągłość układu pomiędzy sąsiednimi komórkami. Ciągłość ta związana jest najprawdopodobniej z tym, że w regionach, gdzie ściana peryklinalna łączy się ze ścianą antyklinalną, prążki w sąsiednich komórkach zorientowane są prostopadle do wspólnej podwójnej ściany antyklinalnej tych komórek (Natonik-Białoń i in. 2020; patrz Aneks An.4).

W komórkach epidermy organów pędowych o cylindrycznym kształcie, takich jak hipokotyl słonecznika, czy koleoptyl jęczmienia, układ prążków nie wykazuje zróżnicowania ani w skali subkomórkowej, ani ponadkomórkowej, ale we wszystkich komórkach prążki są zorientowane poprzecznie (Hejnowicz, Borowska-Wykręt 2005; Lipowczan i in. 2018). Wynika to najprawdopodobniej ze znacznej anizotropii odkształcenia powierzchniowego ściany po zniesieniu naprężeń. W silnie wydłużonych komórkach epidermy hipokotyla słonecznika i koleoptyla jęczmienia, w których naprężenia ścian wynikają zarówno z turgoru, jak i naprężeń tkankowych, całkowite naprężenie rozciągające w kierunku podłużnym jest znacznie większe niż w kierunku poprzecznym (patrz Wstęp; I.2.2; Fig.I.2.2). Tak więc, całkowite zniesienie naprężeń w ścianie, na drodze izolacji tkanki i plazmolizy, powoduje znaczne kurczenie ściany peryklinalnej w kierunku podłużnym i tylko nieznaczne w kierunku poprzecznym (Hejnowicz, Sievers 1995, 1996). Natomiast, jak już wcześniej wspomniano, w epidermie łuski cebuli układ prążków był zróżnicowany w skali subkomórkowej (między częścią równowąską i końcami komórki) i często także ponadkomórkowej (między komórkami).

Jak wspomniano powyżej, układ prążków na wewnętrznej powierzchni ściany jest prawdopodobnie związany z anizotropią odkształcenia powierzchniowego ściany zachodzącego na skutek zniesienia naprężeń (Hejnowicz, Sievers 1995, 1996; Hejnowicz, Borowska-Wykręt 2005). Zarówno w przypadku cebul młodych jak i dojrzałych układ prążków był zróżnicowany w skali subkomórkowej, ale zbliżony w częściach równowąskich oraz na podobnego kształtu końcach różnych komórek. Zatem zakładając, że orientacja prążków jest prostopadła do kierunku maksymalnego odkształcenia (Hejnowicz, Borowska-Wykręt 2005) można wnioskować, że anizotropia odkształcenia zewnętrznej ściany peryklinalnej jest zróżnicowana w obrębie komórki. W związku z tym, w toku dalszych badań poszukiwano odpowiedzi na pytanie, co powoduje lokalne zróżnicowanie anizotropii odkształcenia ściany komórek epidermy, przejawiające się w układzie prążków. Jak omówiono we Wstępie (patrz I.1.2 oraz I.1.3), z licznych badań, przeprowadzonych między innymi na cebuli, wiadomo, że anizotropia odkształcenia ściany zależy od jej właściwości mechanicznych, które w dużej mierze wynikają z układu MF w ścianie. Dlatego zbadano układ MF zarówno w najmłodszych pokładach ściany, czyli na jej wewnętrznej powierzchni, kontaktującej się z protoplastem, jak i na całej grubości ściany. Badania wewnętrznej powierzchni ściany pokazały, że układ MF ma charakter polilamelarny, który zaobserwowano już wcześniej w komórkach abakksjalnej epidermy cebuli (Zhang i in. 2014; 2016). Na obrazach AFM widoczne były fibryle leżące w lamelach powierzchniowych oraz podpowierzchniowych, które często zorientowane były inaczej. Układ ten jest zróżnicowany zarówno w skali subkomórkowej jak i pomiędzy fragmentami ścian z różnych komórek. Zaś układ MF zmierzony na całej grubości ściany w poszczególnych komórkach epidermy cebul młodych i dojrzałych był najczęściej podłużny lub poprzeczny. Jednak w obrębie pojedynczych komórek układ MF był zwykle zbliżony w części równowąskiej i na końcach. Oznacza to, że nie ma zależności pomiędzy układem MF, a lokalną anizotropią odkształcenia zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek epidermy cebuli.

Brak zależności pomiędzy odkształceniem a układem MF w ścianie oraz podobny układ prążków w analogicznych regionach różnych komórek (część równowąska oraz końce o różnych kształtach) pozwalają przypuszczać, że lokalna anizotropia odkształcenia zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek epidermy cebuli wynika przede wszystkim z geometrii tych komórek. Potwierdzeniem tego są badania teoretyczne przeprowadzone na modelu adakksjalnej epidermy cebuli, której komórki połączone są podobnie jak komory dmuchanego materaca kieszeniowego (Natonik-Białoń i in. 2020; Aneks An.4). Symulacji zwiększenia ciśnienia turgorowego w komórkach (analogicznie do deplazmolizy),

przypominającej pompowanie materaca, towarzyszyło odkształcenie zewnętrznej ściany peryklinalnej, które było największe w części równowąskiej, zwłaszcza komórek stosunkowo szerokich i słabo wydłużonych (Ryc.V.4.1 czerwone obramowania), a najmniejsze na końcach ostrych (Ryc.V.4.1 czerwone gwiazdki). Najprawdopodobniej zmniejszeniu ciśnienia turgorowego (plazmoliza), które przypomina spuszczenie powietrza z materaca, towarzyszą takie same odkształcenia, przy czym zamiast rozciągania następuje kurczenie się powierzchni ściany. Symulacje pokazały, że w części równowąskiej wydłużonych komórek, kierunek maksymalnego odkształcenia ściany jest poprzeczny (Ryc.V.4.1 białe obramowania), czyli prostopadły do stwierdzonej empirycznie orientacji prążków, pojawiających się na wewnętrznej powierzchni ściany w tej części komórki po plazmolizie. Również na końcach tępych (Ryc.V.4.1 białe gwiazdki) i ostrych (Ryc.V.4.1 czerwone gwiazdki), gdzie układ prążków jest odpowiednio fontannowy oraz poprzeczny, kierunek maksymalnego odkształcenia ściany był najczęściej prostopadły do orientacji prążków. Ponieważ w symulacjach przyjęto anizotropowe wzmocnienie ścian komórkowych identyczne dla całego fragmentu epidermy, można przyjąć, że lokalna anizotropia odkształcenia powierzchniowego ściany zależy przede wszystkim od geometrii komórki.



Ryc.V.4.1. Symulacja lokalnych odkształceń zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek adaksjalnej epidermy cebuli towarzyszących zwiększeniu ciśnienia turgorowego (Natonik-Białoń i in. 2020; Aneks An.4). Kolorowa skala określa wielkość odkształcenia powierzchniowego ściany. Krzyże wskazują główne kierunki odkształcenia, a długość ich linii zależy od wielkości odkształcenia (białe linie –rozciganie; czerwone linie – kurczenie). Czerwone obramowania – część równowąska komórek stosunkowo szerokich i słabo wydłużonych, białe obramowania – część równowąska komórek wydłużonych, czerwone gwiazdki – końce ostre, białe gwiazdki – końce tępe.

V.5. Artefakty w badaniach układu fibryl celulozowych na wewnętrznej powierzchni ściany przy użyciu AFM.

Widoczność fibryl celulozowych w lamelach powierzchniowych i podpowierzchniowych wewnętrznej powierzchni badanych ścian adaksjalnej epidermy cebuli zależy od procedury przygotowania próbek. Najwyraźniejsze fibryle w lameli powierzchniowej, a także lamelach położonych głębiej, obserwowano w próbkach traktowanych ACE. Zaś na obrazach próbek nietraktowanych chemicznie fibryle zarówno w powierzchniowej, jak i położonych głębiej lamelach, były mniej wyraźne. Oznacza to, że chemiczne traktowanie, które miało na celu wytrawienie pozostałości protoplastu oraz elementów matriks, miało wpływ na obrazowanie fibryl w AFM.

W badaniach na adaksjalnej epidermie cebuli, przedstawionych w niniejszej pracy, suszenie próbek było niezbędne, aby możliwa była ekspozycja wewnętrznej powierzchni ściany, a wytrawianie pozwalało na odsłonięcie fibryl zanurzonych w matriks oraz polepszenie jakości obrazów AFM. Należy jednak pamiętać, że zarówno suszenie, jak i chemiczne traktowanie próbek mogły wpływać na obraz fibryl. Wielu autorów stwierdziło, że suszenie próbek, które następnie obserwowane były w AFM, powodowało artefakty, takie jak zaburzenie tekstury obrazu oraz zwiększenie średnicy widocznych na obrazach fibryl. Przykładowo, na obrazach AFM wewnętrznej powierzchni ściany komórek epidermy z abaksjalnej łuski cebuli pochodzących z próbek suszonych i obserwowanych na sucho widoczna była tekstura przypominająca „koronkowy wzór” zamiast polilamelarnej struktury ściany widocznej w próbkach nigdy nie suszonych i obserwowanych na mokro (Zhang i in. 2014). Może to być skutkiem tego, że elementy matriks pod wpływem suszenia przyczepiają się i oblepiają powierzchnię fibryl. „Koronkowych wzorów” nie zaobserwowano jednak w epidermie adaksjalnej, być może ze względu na inny skład ściany i zastosowane traktowanie chemiczne. Badania przeprowadzone na komórkach miękiszu selera (*Apium graveolens*) (Thimm i in. 2000) oraz jednokomórkowych włoskach bawełny (*Gossypium hirsutum*) (Pesacreta i in. 1997) wykazały, że zawartość wody w ścianie ma wpływ na średnicę znajdujących się w niej fibryl. Widoczne na obrazach AFM fibryle miały mniejszą średnicę, gdy badano ściany dobrze uwodnione, i większą, gdy badano ściany odwodnione różnymi metodami (suszenie w temperaturze pokojowej, suszenie przez zamrażanie w ciekłym azocie oraz odwadnianie etanolem). Prawdopodobnie jest to spowodowane tym, że na skutek odwodnienia odległość między MF w ścianie zmniejsza się, co może prowadzić do ich łączenia się w pęczki (Thimm i in. 2000; Pesacreta i in. 1997). Ponadto zaobserwowano, że układ fibryl w uwodnionych ścianach komórek miękiszu selera

był bardziej uporządkowany niż w ścianach odwodnionych (Thimm i in. 2000). Z badań na komórkach hipokotyli ogórka (*Cucumis sativus*) wynika jednak, że odwodnienie ściany nie powoduje znaczących rearanżacji w układzie MF (Marga i in. 2005). Eksperymenty przeprowadzone na fragmentach ścian homogenizowanych łusek cebuli (próbki zawierające fragmenty ścian komórek miękiszu i epidermy) wykazały, że uwodnienie ściany ma istotny wpływ na pektyny, będące składnikiem matriks (Ha i in. 1997). W ścianach uwodnionych pektyny są bowiem napężniałe i przyjmują strukturę żelu, a podczas suszenia ściany, kurczą się i sztywnieją. Tak więc, suszenie ściany powoduje zmniejszenie jej grubości, które wynika prawdopodobnie z zapadania się przestrzeni między sąsiednimi lamelami, podczas którego MF znajdujące się w kolejnych lamelach ściany zbliżają się do siebie, a nawet łączą się w pęczki (Ha i in. 1997). Przyleganie do siebie MF w odwodnionej ścianie zaobserwowano również w komórkach kolenchymy ogonka liściowego selera (Thomas i in. 2013). Odwodnienie ściany wpływa więc znacząco na średnicę obserwowanych fibryl.

W procedurze prześwietlania i barwienia tkanek roślinnych stosuje się 5-10% NaOH oraz roztwór chlorku bielącego w celu wyługowania zawartości komórek (Broda 1971). W związku z tym w niniejszej pracy, aby usunąć elementy matriks i resztki protoplastu oraz polepszyć widoczność fibryl na wewnętrznej powierzchni ściany, próbki traktowano odpowiednio ACE (wybielacz zawierający 4,5% NaClO; podchloryn sodu) oraz 5% NaOH w różnych kombinacjach w zależności od przeprowadzanej procedury. Należy pamiętać, że zmiany zachodzące w ścianie na skutek wytrawiania elementów matriks mogą być podobne do zmian wywołanych suszeniem. W badaniach przeprowadzonych na komórkach kalusa *A. thaliana* oraz miękiszu cebuli i selera elementy matriks ściany usuwano traktując próbki różnymi, 1M lub 4M, stężeniami KOH (wodorotlenek potasu). Zaobserwowano, że powoduje to pęcznienie oraz zwiększenie średnicy fibryl widocznych na obrazach AFM, które najprawdopodobniej jest spowodowane łączeniem się w wiązki pojedynczych MF (McCann i in. 1990; Davies, Harris 2003; Thimm i in. 2009). Im większe było stężenie KOH, tym wyraźniejsze były zmiany w wyglądzie fibryl (McCann i in. 1990). Mechanizmy pęcznienia oraz łączenia się MF w wiązki zaobserwowane podczas wytrawiania elementów matriks oraz suszenia ścian są więc prawdopodobnie podobne. Być może podczas suszenia elementy matriks, które podczas wytrawiania są usuwane, ulegają obkurczeniu, a tym samym powodują kurczenie się ściany, co skutkuje zbliżeniem MF do siebie i formowaniem wiązek (Ha i in. 1997; Thimm i in. 2009). W niniejszej pracy do wytrawiania ścian stosowano 5% NaOH, który podobnie jak KOH jest mocną zasadą. Zastosowane stężenie NaOH jest zbliżone do 1M KOH (~5,3% KOH). Zatem zarówno chemiczne traktowanie ścian jak

i suszenie mogło się przyczynić do łączenia pojedynczych MF w wiązki. Średnica fibryl mogła być również zwiększona na skutek ich oblepienia przez pozostałości elementów matriks, które nie uległy wytrawieniu. Wyjaśnia to, dlaczego fibryle widoczne na obrazach AFM z adaksjalnej epidermy cebuli wydają się mieć większą średnicę niż na obrazach otrzymanych dla abaksjalnej epidermy cebuli (Zhang i in. 2014; 2016). Mimo to obrazy otrzymane na potrzeby tej pracy były wystarczające, by zaobserwować polilamelarny układ fibryl oraz określić ich orientację względem osi komórki.

V.6. Orientacja fibryl celulozowych w ścianie komórek epidermy łusek cebuli na różnych etapach rozwojowych.

Orientacja fibryl celulozowych na całej grubości ściany (MFA określany za pomocą mikroskopu polaryzacyjnego), zarówno w cebulach młodych, jak i dojrzałych była najczęściej albo poprzeczna (MFA bliskie 90° lub -90°), albo podłużna (MFA bliskie 0°). Prawdopodobnie wynika to z faktu, że MFA jest różne dla różnych łusek danej cebuli i zależy od etapu rozwojowego łuski (Suslov i in. 2009). Orientacja MF w ścianie komórek epidermy cebul młodych, które nie zakończyły jeszcze wzrostu, jest podłużna (MFA bliskie 0°) w trzeciej i kolejnych łuskach (liczonych w kierunku do wnętrza cebuli). Natomiast w dwóch zewnętrznych łuskach orientacja MF jest zbliżona do podłużnej lub losowa (Suslov, Verbelen 2006), co sugeruje, że zaczyna zmieniać się na poprzeczną. Suslov i współpracownicy (2009) pokazali, że podczas rozwoju cebuli orientacja MF w ścianie komórek epidermy adaksjalnej zmienia się kilkakrotnie: (i) na początku tworzenia cebuli orientacja MF jest poprzeczna, a komórki rosną wtedy głównie na długość; (ii) w drugim etapie następuje zmiana orientacji MF, dlatego ich układ jest losowy; (iii) w trzecim etapie orientacja MF jest podłużna, a komórki rosną na szerokość, co przyczynia się do powstawania kulistego kształtu cebuli; (iv) w ostatnim etapie orientacja MF zmienia się ponownie na poprzeczną. Pierwszy etap, gdy MF zorientowane są poprzecznie, a komórki rosną przede wszystkim na długość, jest bardzo krótki, przez co trudno go zaobserwować (Suslov i in. 2009).

Suslov i współpracownicy badali epidermę pochodzącą z cebul bardzo młodych oraz młodych, zbieranych wczesnym latem (czerwiec), które jeszcze nie zakończyły wzrostu (Suslov, Verbelen 2006; Suslov i in. 2009). Badania przedstawione w niniejszej pracy prowadzono natomiast na cebulach młodych, prawdopodobnie odpowiadających młodym cebulom badanym przez Suslova i Verbelena (2006), oraz cebulach dojrzałych, starszych od cebul badanych przez Suslova i współpracowników (2006; 2009), które zakończyły już

wzrost. Ponadto cebule pochodziły od lokalnego dostawcy, w związku z tym nie wiadomo, ile łusek zostało z nich usuniętych przed sprzedażą. Dlatego też należy zachować ostrożność podczas porównywania orientacji MF pomiędzy łuskami pochodzącymi z różnych cebul, ponieważ nie można mieć pewności, czy porównywane są łuski o takim samym położeniu względem powierzchni cebuli.

VI. Wnioski.

- Plazmolizie oraz deplazmolizie komórek adaksjalnej epidermy łuski cebuli towarzyszy odpowiednio zmniejszenie lub zwiększenie objętości komórki (potwierdzona została pierwsza hipoteza robocza). Choć zmianom objętości tych komórek towarzyszą tylko nieznaczne odkształcenia powierzchniowe, czyli odpowiednio zmniejszenie lub zwiększenie pola powierzchni, ich zewnętrznej ściany peryklinalnej, wyraźnie zmienia się krzywizna tej ściany. Poprzeczny kierunek odkształcenia o największej wartości bezwzględnej sugeruje, że na skutek traktowania osmotycznego komórki epidermy zmieniają kształt i rozmiar podobnie do komór materaca.
- Odkształcenie objętościowe towarzyszące traktowaniu osmotycznemu jest większe w komórkach pochodzących z cebul młodych, których ściany są z natury cieńsze i bardziej elastyczne, oraz wtedy, gdy wielkość zmiany ciśnienia osmotycznego jest maksymalna (czyli zmiana z roztworu hipotonicznego na hipertoniczny). Ponadto, wielkość odkształcenia objętościowego komórek może zależeć od ich kształtu (w przypadku epidermy cebul dojrzałych) lub rozmiaru (w przypadku cebul młodych). Potwierdza to drugą hipotezę roboczą.
- W przypadku komórek epidermy cebul młodych, wstępnie traktowanych roztworem hipotonicznym, odkształcenie objętościowe towarzyszące deplazmolizie jest często większe niż wartość bezwzględna odkształcenia towarzyszącego plazmolizie tych samych komórek, prawdopodobnie ze względu na wiskoelastyczne odkształcenie ściany komórkowej.
- Niektóre komórki o jądrach zabarwionych jodkiem propidyny, co sugeruje, że są to komórki martwe, zwiększają objętość w trakcie plazmolizy. Jest to prawdopodobnie bierne odkształcenie komórek martwych zachodzące na skutek odkształcenia żywych komórek sąsiednich. Potwierdza to trzecią hipotezę roboczą.
- Traktowanie osmotyczne może powodować tymczasową permeabilizację błony komórkowej, która umożliwia wnikanie jodku propidyny do wnętrza żywych komórek

epidermy cebuli. Prawdopodobnie komórki pochodzące z cebul młodych są bardziej podatne na permeabilizację błony niż komórki epidermy cebul dojrzałych.

- Anizotropia odkształcenia powierzchniowego zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek adaksjalnej epidermy cebuli, określana na podstawie wzoru prążków powstających na skutek wyboczenia po zniesieniu naprężeń, jest zróżnicowana w obrębie pojedynczej komórki. Nie zależy ona od układu fibryl celulozowych w ścianie, ale od geometrii komórki. Czwarta hipoteza robocza została zatem tylko częściowo potwierdzona.

VII. Literatura.

- Armour W.J., Barton D.A., Law A.M.K., Overall R.L. 2015.** *Differential growth in periclinal and anticlinal walls during lobe formation in Arabidopsis cotyledon pavement cells.* The Plant Cell 27:2484–2500
- Barbier de Reuille P., Routier-Kierzkowska A., Kierzkowski D., Bassel G.W., Schüpbach T., Tauriello G., Bajpai N., Strauss S., Weber A., Kiss A., Burian A., Hofhuis H., Sapala A., Lipowczan M., Heimlicher M.B., Robinson S., Bayer E.M., Basler K., Koumoutsakos P., Roeder A.H.K., Aegerter-Wilmsen T., Nakayama N., Tsiantis M., Hay A., Kwiatkowska D., Xenarios I., Kuhlemeier C., Smith R.S. 2015.** *MorphoGraphX: A platform for quantifying morphogenesis in 4D.* eLife DOI:10.7554/eLife.05864
- Baskin T.I. 2001.** *On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model.* Protoplasma 215:150-171
- Baskin T.I. 2005.** *Anisotropic expansion of the plant cell wall.* The Annual Review of Cell and Developmental 21:203-222
- Baskin T.I., Jensen O.E. 2013.** *On the role of stress anisotropy in the growth of stems.* Journal of Experimental Botany 64:4697-4707
- Berens P. 2009.** *CircStat: A MATLAB Toolbox for Circular Statistics.* Journal of Statistical Software 31:1-21
- Bidhendi A.J., Geitmann A. 2016.** *Relating the mechanism of the primary plant cell wall to morphogenesis.* Journal of Experimental Botany 67:449-461
- Bolduc J., Lewis L., Aubin C., Geitmann A. 2006.** *Finite-element analysis of geometrical factors in micro-indentation of pollen tubes.* Biomechanics and Modeling in Mechanobiology 5:227-236
- Bonham V.A., Barnett J.R. 2001.** *Fiber length and microfibril angle in Silver Birch (Betula pendula Roth.).* Holzforschung 55:159-162
- Borowska-Wykręt D., Rypień A., Dulski M., Grelowski M., Wrzalik R., Kwiatkowska D. 2017.** *Gradient of structural traits drives hygroscopic movements of scarious bracts surrounding Helichrysum bracteatum capitulum.* Annals of Botany 119:1365–1383
- Boudaoud A., Burian A., Borowska-Wykręt D., Uyttewaal M., Wrzalik R., Kwiatkowska D., Hamant O. 2014.** *FibrilTool, an ImageJ plug-in to quantify fibrillar structures in raw microscopy images.* Nature Protocols 9:457-463
- Bringmann M., Li E., Sampathkumar A., Kocabek T., Hauser M-T, Persson S. 2012.** *POM-POM2/CELLULOSE SYNTHASE INTERACTING1 Is Essential for the*

Functional Association of Cellulose Synthase and Microtubules in Arabidopsis. The Plant Cell 24:163–177

Broda B. 1971. *Metody histochemii roślinnej*. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich. Warszawa. pp.80-82

Burgert I., Fratzl P. 2009. *Plants control the properties and actuation of their organs through the orientation of cellulose fibrils in their cell wall*. Integrative and Comparative Biology 49:69-79

Burgert I., Keckes J., Frühmann K., Fratzl P. Tschegg S.E. 2002. *A comparison of two techniques for wood fiber isolation-evaluation by tensile tests on single fibers with different microfibril angle*. Plant Biology 4:9-12

Burian A. 2007. *Wpływ wzrostu modulowanego pH i naprężeniem na układ mikrotubul kortykalnych w epidermie hipokotyła słonecznika*. Praca doktorska, Uniwersytet Śląski w Katowicach.

Cave I.D. 1969. *The longitudinal Young's modulus of Pinus radiata*. Wood Science and Technology 3:40-48

Chan J., Crowell E., Eder M., Calder G., Bunnewell S., Findlay K., Vernhettes S., Höfte H., Lloyd C. 2010. *The rotation of cellulose synthase trajectories is microtubule dependent and influences the texture of epidermal cell walls in Arabidopsis hypocotyls*. Journal of Cell Science 123:3490-3495

Cosgrove D.J. 1997. *Relaxation in high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement*. The Plant Cell 9:1031-1041

Cosgrove D.J. 2016. *Plant cell wall extensibility: connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes*. Journal of Experimental Botany 67:463-476

Cosgrove D.J., Jarvis M.C. 2012. *Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls*. Frontiers in Plant Science 3:1-6

Crowell E.F., Timpano H., Desprez T., Franssen-Verheijen T., Emons A.M., Höfte H., Vernhettes S. 2011. *Differential regulation of cellulose orientation at the inner and outer face of epidermal cells in the Arabidopsis hypocotyl*. The Plant Cell 23:2592-2605

Da Silva Pedrini M. R., Dupont S., de Anchieta Câmara Jr A., Beney L., Gervais P. 2014. *Osmoporation: a simple way to internalize hydrophilic molecules into yeast*. Applied Microbiology and Biotechnology 98:1271-1280

Davey H. M., Hexley P. 2011. *Red but not dead? Membranes of stressed Saccharomyces cerevisiae are permeable to propidium iodide*. Environmental Microbiology 13:163-171

- Davies L.M., Harris P.J. 2003.** *Atomic force microscopy of microfibrils in primary cell walls.* *Planta* 217:283-289
- Dawson C., Vincent J.F.V., Rocca A.M. 1997.** *How pine cones open.* *Nature* 390:101-107
- De Vries H. 1877.** *Untersuchungen über die mechanischen ursachen der zellstreckung ausgehend von der einwirkung von salzlosungen auf den turgor wachsender pflanzenzellen.* Leipzig: Engelmann
- Diekmann W., Hedrich R., Raschke K., Robinson D.G. 1993.** *Osmocytosis and vacuolar fragmentation in guard cell protoplasts: their relevance to osmotically-induced volume changes in guard cells.* *Journal of Experimental Botany* 44:1569–1577
- Dobrakowska-Kopecka Z. 1996.** *Warzywa i zioła z mojego ogródka.* Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa. pp. 98-102
- Duckett C.M., Oparka K.J., Prior D.A.M., Dolan L., Roberts K. 1994.** *Dye-coupling in the root epidermis of Arabidopsis progressively reduced during development.* *Development* 120:3247-3255
- Dupont S., Beney L., Ritt J.F., Lherminier J., Gervais P. 2010.** *Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration.* *Biochimica et Biophysica Acta* 1798: 975-985
- Endler A., Kesten C., Schneider R., Zhang Y., Ivakov A., Froehlich A., Funke N., Persson S. 2015.** *A Mechanism for Sustained Cellulose Synthesis during Salt Stress.* *Cell* 162:1353-1364
- Erwee M.G., Goodwin P.B. 1984.** *Characterization of the Egeria densa leaf symplast: response to plasmolysis, deplasmolysis and to aromatic amino acid.* *Protoplasma* 122:162-168
- Ferrando M., Spiess W.E.L. 2001.** *Cellular response of plant tissue during the osmotic treatment with sucrose, maltose, and trehalose solutions.* *Journal of Food Engineering* 49:115-127
- Giddings T., Staehelin L. 1991.** *W The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form.* Lloyd C.W. Ed. Academic Press New York. pp. 85-99
- Green P. B. 1962.** *Mechanism for Plant Cellular Morphogenesis.* *Science* 138:1404-1405
- Groom L., Mott L., Shaler S. 2002.** *Mechanical properties of individual southern pine fibers. Part I. Determination and variability of stress-strain curves with respect to tree height and juvenility.* *Wood Fiber Science* 34:14-27

- Ha M.A., Apperley D.C., Jarvis M.C. 1997.** *Molecular rigidity in dry and hydrated onion cell walls.* Plant Physiology 115:593-598
- Hamant O., Das P., Burian A. 2014.** *Time-lapse imaging of developing meristems using confocal laser scanning microscope.* Plant Cell Morphogenesis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Žárský V, Cvrčková F (eds), Springer Science+Business Media New York 1080: 111-120
- Haruta M., Gray W.M., Sussman M.R. 2015.** *Regulation of the plasma membrane proton pump (H^+ -ATPase) by phosphorylation.* Current Opinion in Plant Biology 28:68-75
- Heath I.B. 1974.** *A Unified Hypothesis for the Role of Membrane Bound Enzyme Complexes and Microtubules in Plant Cell Wall Synthesis.* Journal theoretical Biology 48:445-449
- Hejnowicz Z. 1973.** *Anatomia rozwojowa drzew.* PWN Warszawa. pp.436-440
- Hejnowicz Z. 1997.** *Graviresponses in herbs and trees: a major role for the redistribution of tissue and growth stresses.* Planta 203:S136-S146
- Hejnowicz Z. 1999.** *Anizotropia naprężeń w ścianach komórkowych a wpływ auksyny na szybkość wzrostu pędu i korzenia.* Postępy Biologii Komórki 26:71-82
- Hejnowicz Z. 2012.** *Anatomia i histogeneza roślin naczyniowych. Organy wegetatywne.* PWN Warszawa. pp.15-37, 212-213, 220-223
- Hejnowicz Z., Borowska-Wykręt D. 2005.** *Buckling of inner cell wall layers after manipulations to reduce tensile stress: observations and interpretations for stress transmission.* Planta 220:465-473
- Hejnowicz Z., Sievers A. 1995.** *Tissue stresses in organs of herbaceous plants. II. Determination in three dimensions in the hypocotyl of sunflower.* Journal of Experimental Botany 46:1045-1053
- Hejnowicz Z., Sievers A. 1996.** *Tissue stresses in organs of herbaceous plants. III. Elastic properties of the tissues of sunflower hypocotyl and origin of tissue stresses.* Journal of Experimental Botany 47:519-528
- Himmelsbach R., Williamson R.E., Wasteneys G.O. 2003.** *Cellulose microfibril alignment recovers from DCB-induced disruption despite microtubule disorganization.* The Plant Journal 36:565-57
- Kerstens S., Decraemer W.F., Verbelen J.P. 2001.** *Cell Walls at the Plant Surface Behave Mechanically Like Fiber-Reinforced Composite Materials.* Plant Physiology 127:381-385

- Kierzkowski D., Nakayama N., Routier-Kierzkowska A.L., Weber A., Bayer E., Schorderet M., Reinhardt D., Kuhlemeier C., Smith R.S. 2012.** *Elastic domains regulate growth and organogenesis in the plant shoot apical meristem.* Science 335:1096-1099
- Küster E. 1929.** *Pathologie der pflanzenzellen.* Teil 1. Protoplasma. Monograph 3. Berlin: Gebrüder Borntraeger.
- Lang I., Barton D.A., Overall R.L. 2004.** *Membrane-wall attachments in plasmolysed plant cells.* Protoplasma 224:231-243
- Lang I., Sassmann S., Schmidt B., Komis G. 2014.** *Plasmolysis: Loss of turgor and beyond.* Plants 3:583-593
- Lang-Pauluzzi I. 2000.** *The behaviour of the plasma membrane during plasmolysis: a study by UV microscopy.* Journal of Microscopy 198:188-198
- Lee-Stadelmann O.Y., Bushnell W.R., Stadelmann E.J. 1984.** *Changes of plasmolysis form in epidermal cells of Hordeum vulgare infected by Erysiphe graminis: evidence for increased membrane-wall adhesion.* Canadian Journal of Botany 62:1714-1723
- Leney L. 1981.** *A technique for measuring fibril angle using polarized light.* Wood and Fiber 13:13-16
- Lindström H., Evans J.W., Verrill S.P. 1998.** *Influence of cambial age and growth conditions on microfibril angle in young Norway spruce (Picea abies [L.] Karst.).* Holzforschung 52:573-581
- Lipowczan M., Borowska-Wykręt D., Natonik-Białoń S., Kwiatkowska D. 2018.** *Growing cell walls show a gradient of elastic strain across their layers.* Journal of Experimental Botany 69:4349-4362
- Liu Z., Schneider R., Kesten C., Zhang Y., Somssich M., Zhang Y., Fernie A.R., Persson S. 2016.** *Cellulose-Microtubule Uncoupling Proteins Prevent Lateral Displacement of Microtubules during Cellulose Synthesis in Arabidopsis.* Developmental Cell 38:305-315
- Love G.D., Snape C.E., Jarvis M.C. 1998.** *Comparison of leaf and stem cell-wall components in barley straw by solid-state ¹³C NMR.* Phytochemistry 49:1191-1194
- Marga F., Grandbois M., Cosgrove D.J., Baskin T.I. 2005.** *Cell wall extension results in the coordinate separation of parallel microfibrils: evidence from scanning electron microscopy and atomic force microscopy.* The Plant Journal 43:181-190
- Martin C., Bhatt K., Baumann K. 2001.** *Shaping in plant cells.* Current Opinion in Plant Biology 4:540-549

- McCann M.C., Wells B., Roberts K. 1990.** *Direct visualization of cross-links in primary cell wall.* Journal of Cell Science 96:323-334
- McQueen-Mason S., Durachko D.M., Cosgrove D.J. 1992.** *Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants.* The Plant Cell 4:1425-1433
- McQueen-Mason S.J., Fry S.C., Durachko D.M., Cosgrove D.J. 1993.** *The relationship between xyloglucan endotransglycosylase and in-vitro cell wall extension in cucumber hypocotyls.* Planta 190:327-331
- Morris G.J., Winters L., Coulson G.E., Clarke K.J. 1986.** *Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast Saccharomyces cerevisiae.* Journal of General Microbiology 129:2023-2034
- Mosca G., Sapala A., Strauss S., Routier-Kierzkowska A.L., Smith R.S. 2017.** *On the micro-indentation of plant cells in a tissue context.* Physical Biology 14:015003
- Nagata T., Nemoto Y., Hasezawa S. 1992.** *Tobacco BY-2 cell line as the 'HELA' CELL in the cell biology of higher plants.* International Review of Cytology 132:1-30
- Natonik-Białoń S., Borowska-Wykręt D., Mosca G., Grelowski M., Wrzałik R., Smith R., Kwiatkowska D. 2020.** *Deformation of a cell monolayer due to osmotic treatment: a case study of onion scale epidermis.* Botany 98:21–36
- Oparka K.J. 1994.** *Plasmolysis: new insights into an old process.* New Phytologist 126:571-591
- Oparka K.J., Prior D.A.M., Harris N. 1990.** *Osmotic induction of fluid-phase endocytosis in onion epidermal cells.* Planta 180:555-561
- Paluch E., Lubawy J., Polcyn W. 2015.** *Akwaporyny roślinne – funkcje i czynniki regulujące ich aktywność.* Postępy Biologii Komórki 42:207-226
- Panteris E., Galatis B. 2005.** *The morphogenesis of lobed plant cells in the mesophyll and epidermis: organization and distinct roles of cortical microtubules and actin filaments.* New Phytologist 167:721-732
- Paolillo D.J. Jr. 2000.** *Axis elongation can occur with net longitudinal orientation of wall microfibrils.* New Phytologist 145:449-455
- Paradez A.R., Somerville C.R., Ehrhardt D.W. 2006.** *Visualization of Cellulose Synthase Demonstrates Functional Association with Microtubules.* Science 312:1491-1495
- Park Y.B., Cosgrove D.J. 2012.** *Changes in cell wall biomechanical properties in the xyloglucan-deficient xxt1/xt2 mutant of Arabidopsis.* Plant Physiology 158:465-475

- Pesacreta T.C., Carlson L.C., Triplett B.A. 1997.** *Atomic force microscopy of cotton fiber cell wall surfaces in air and water: quantitative and qualitative aspects.* *Planta* 202:435-442
- Pont-Lezica R.F., McNally J.G., Pickard B.G. 1993.** *Wall-to-membrane linkers in onion epidermis: some hypotheses.* *Plant, Cell and Environment* 16:111-123
- Proseus T.E., Ortega J.K.E., Boyer J.S. 1999.** *Separating growth from elastic deformation during cell enlargement.* *Plant Physiology* 119:775-784
- Reiterer A., Lichtenegger H., Tschegg S., Fratzl P. 1999.** *Experimental evidence for a mechanical function of the cellulose microfibril angle in wood cell walls.* *Philosophical Magazine A* 79:2173-2184
- Rounds C.M., Lubeck E., Hepler P.K., Winship L.J. 2011.** *Propidium iodide competes with Ca^{2+} to label pectin in pollen tubes and Arabidopsis root hairs.* *Plant Physiology* 157:175-187
- Routier-Kierzkowska A.L., Weber A., Kochova P., Felekis D., Nelson B.J., Kuhlemeier C., Smith R.S. 2012.** *Cellular force microscopy for in vivo measurements of plant tissue mechanics.* *Plant Physiology* 158:1514-1522
- Ruan Y.L., Llewellyn D.J., Furbank R.T. 2001.** *The control of single-celled cotton fiber elongation by developmentally reversible gating of plasmodesmata and coordinated expression of sucrose and K^+ transporters and expansin.* *Plant Cell* 13:47-60
- Schumacher K., Krebs M. 2010.** *The V-ATPase: small cargo, large effects.* *Current Opinion in Plant Biology* 13:724-730
- Schumacher K., Vafeados D., McCarthy M., Sze H., Wilkins T., Chory J. 1999.** *The Arabidopsis det3 mutant reveals a central role for the vacuolar H^+ -ATPase in plant growth and development.* *Genes & Development* 13:3259-3270
- Smart L.B., Vojdani F., Maeshima M., Wilkins T.A. 1998.** *Genes involved in osmoregulation during turgor-driven cell expansion of developing cotton fibers are differentially regulated.* *Plant Physiology* 116:1539-1549
- Steudle E., Zimmermann U. 1977.** *Effect of turgor pressure and cell size on the wall elasticity of plant cells.* *Plant Physiology* 59:285-289
- Strasburger E., Noll F., Schenck H., Schimper A.F.W. 1983.** *Lehrbuch der Botanik*, 32nd edn (eds D. von Denffer, H. Ziegler, F. Ehrendorfer, A. Dresinsky). G Fischer Stuttgart. pp. 84

- Sugimoto K., Himmelspach R., Williamson R.E., Wasteneys G.O. 2003.** *Mutation or drug-dependent microtubule disruption causes radial swelling without altering parallel cellulose microfibril deposition in Arabidopsis root cells.* The Plant Cell 15:1414-1429
- Suslov D., Verbelen J.P. 2006.** *Cellulose orientation determines mechanical anisotropy in onion epidermis cell walls.* Journal of Experimental Botany 57:2183-2192
- Suslov D., Verbelen J.P., Vissenberg K. 2009.** *Onion epidermis as a new model to study the control of growth anisotropy in higher plants.* Journal of Experimental Botany 60:4175-4187
- Takeda K., Shibaoka H. 1981.** *Changes in microfibril arrangement on the inner surface of the epidermal cell walls in the epicotyl of Vigna angularis Ohwi et Ohashi during cell growth.* Planta 151:385-392
- Thimm J.C., Burritt D.J., Ducker W.A., Melton L.D. 2000.** *Celery (Apium graveolens L.) parenchyma cell walls examined by atomic force microscopy: effect of dehydration on cellulose microfibrils.* Planta 212:25-32
- Thimm J.C., Burritt D.J., Ducker W.A., Melton L.D. 2009.** *Pectins influence microfibril aggregation in celery cell walls: An atomic force microscopy study.* Journal of Structural Biology 168:337-344
- Thomas L.H., Forsyth T., Štuncová A., Kennedy C.J., May R.P., Altaner C.M., Apperley D.C., Wess T.J., Jarvis M.C. 2013.** *Structure of cellulose microfibrils in primary cell walls from collenchyma.* Plant Physiology 161:465-476
- Vanstreels E., Alamar M.C., Verlinden B.E., Enninghorst A., Loodts J.K.A., Tijssens E., Ramon H., Nikolaï B.M. 2005.** *Micromechanical behavior of onion epidermal tissue.* Postharvest Biology and Technology 37:163-173
- Verbelen J.P., Kerstens S. 2000.** *Polarization confocal microscopy and Congo Red fluorescence: a simple and rapid method to determine the mean cellulose fibril orientation in plants.* Journal of Microscopy 198:101-107
- Verbelen J.P., Vissenberg K., Kerstens S., Le J. 2001.** *Cell expansion in the epidermis: microtubules, cellulose orientation and wall loosening enzymes.* Journal of Plant Physiology 158:537-543
- Veytsman B.A., Cosgrove D.J. 1998.** *A model of cell wall expansion based on thermodynamics of polymer networks.* Biophysical Journal 75:2240-2250
- Wasteneys G.O. 2004.** *Progress in understanding the role of microtubules in plant cells.* Current Opinion in Plant Biology 7:651-660

- Weber A., Braybrook S., Huflejt M., Mosca G., Routier-Kierzkowska A.L., Smith R.S. 2015.** *Measuring the mechanical properties of plant cells by combining micro-indentation with osmotic treatments.* Journal of Experimental Botany 66:3229-3241
- Wei C., Lintilhac P.M., Tanguay J.J. 2001.** *An insight into cell elasticity and load-bearing ability. Measurement and theory.* Plant Physiology 126:1129-1138
- Xiao C., Zhang T., Zheng Y., Cosgrove D.J., Anderson C.T. 2016.** *Xyloglucan deficiency disrupts microtubule stability and cellulose biosynthesis in Arabidopsis, altering cell growth and morphogenesis.* Plant Physiology 170:234-249
- Zhang T., Mahgoudy-Louyeh S., Tittmann B., Cosgrove D.J. 2014.** *Visualization of the nanoscale pattern of recently-deposited cellulose microfibrils and matrix materials in never-dried primary walls of the onion epidermis.* Cellulose 21:853-862
- Zhang T., Zheng Y., Cosgrove D.J. 2016.** *Spatial organization of cellulose microfibrils and matrix polysaccharides in primary plant cell walls as imaged by multichannel atomic force microscopy.* The Plant Journal 85:179-192
- Zimmermann U. 1978.** *Physics of turgor- and osmoregulation.* Annual Review of Plant Physiology 29:121-148

VIII. Streszczenie/Summary.

VIII.1. Streszczenie.

Wykorzystując adaksjalną epidermę łuski cebuli (*Allium cepa*) badano zależność odkształcenia towarzyszącego plazmolizie oraz deplazmolizie od właściwości mechanicznych ścian komórkowych oraz geometrii komórek. Tkanka ta jest słabo przyczepiona do leżącego pod nią miększu, przez co brak w niej naprężeń tkankowych, a ponadto można ją łatwo wyizolować bez uszkodzenia komórek. Plazmoliza oraz deplazmoliza komórek epidermy cebuli powodują więc odpowiednio całkowite zniesienie lub odtworzenie naprężeń rozciągających ścianę komórkową, którym towarzyszy odkształcenie ściany.

W trakcie badań testowano następujące hipotezy robocze:

Hipoteza 1: Plazmolizie oraz deplazmolizie komórek adaksjalnej epidermy łuski cebuli towarzyszy odpowiednio zmniejszenie oraz zwiększenie objętości komórki oraz powierzchni zewnętrznej ściany peryklinalnej.

Hipoteza 2: Wielkość odkształcenia objętościowego oraz powierzchniowego towarzyszącego plazmolizie oraz deplazmolizie zależy od: stopnia dojrzałości cebuli, z której pochodzą badane komórki epidermy; wielkości zmiany ciśnienia osmotycznego; kształtu i rozmiarów komórek.

Hipoteza 3: Odkształcenie komórek martwych towarzyszące traktowaniu osmotycznemu epidermy zależy od odkształcenia komórek sąsiednich.

Hipoteza 4: Anizotropia towarzyszącego plazmolizie odkształcenia powierzchniowego zewnętrznej ściany peryklinalnej komórki epidermy cebuli zależy od geometrii komórki, anizotropii naprężenia w ścianie komórki w stanie turgoru oraz anizotropowych właściwości mechanicznych ściany.

W pierwszej kolejności w mikroskopie konfokalnym przeprowadzono przyżyciowe obrazowanie komórek, których ściany barwiono jodkiem propidyny (*Propidium Iodide* - PI). Barwienie komórek PI dodatkowo pozwoliło określić żywotność komórek, ponieważ komórki o jądrach zabarwionych PI w literaturze często uznawane są za martwe. Następnie wykorzystując obrazy otrzymane w mikroskopie konfokalnym oraz program MorphoGraphX obliczano odkształcenia towarzyszące traktowaniu osmotycznemu komórek. Na tej podstawie stwierdzono, że odkształcenia objętościowe większości komórek o jądrach niezabarwionych PI są zgodne z oczekiwaniami, tj. plazmolizie oraz deplazmolizie towarzyszy odpowiednio zmniejszenie oraz zwiększenie objętości komórek (potwierdzono pierwszą hipotezę roboczą).

Następnie poszukiwano czynników wpływających na wielkość tych odkształceń. W tym celu porównywano odkształcenia objętościowe, towarzyszące plazmolizie oraz

deplazmolizie, komórek pochodzących z cebul młodych i dojrzałych, które przed plazmolizą inkubowano w roztworze hipotonicznym lub izotonicznym zawierającym PI. Badania te wykazały, że odkształcenia objętościowe są większe w komórkach pochodzących z cebul młodych, których ściany są najprawdopodobniej cieńsze i bardziej elastyczne niż w przypadku komórek cebul dojrzałych. Większe odkształcenia objętościowe stwierdzono również wtedy, gdy zmiana ciśnienia osmotycznego jest większa: przy przejściu z roztworu hipotonicznego do hipertonicznego zmiana jest większa niż przy przejściu z roztworu izotonicznego do hipertonicznego. Ponadto badania wykazały, że wielkość odkształcenia objętościowego może zależeć od kształtu oraz rozmiaru komórek (potwierdzono zatem drugą hipotezę roboczą).

Badano również odkształcenia objętościowe towarzyszące plazmolizie oraz deplazmolizie komórek o jądrach zabarwionych PI. Wbrew założeniu, że komórki te są martwe, stwierdzono, że część z nich odkształcała się podobnie jak komórki o jądrach niezabarwionych PI (tj. plazmolizie towarzyszyło zmniejszenie, a deplazmolizie zwiększenie objętości komórek). Z badań na komórkach drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) wiadomo jednak, że traktowaniu osmotycznemu towarzyszy tymczasowe zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej, co umożliwia wnikanie PI do jąder żywych komórek. Być może traktowanie osmotyczne powoduje podobną permeabilizację błony w komórkach epidermy cebuli. Prawdopodobnie więc część komórek o jądrach zabarwionych PI była żywa i dlatego odkształcała się zgodnie z oczekiwaniami. Inne komórki o jądrach zabarwionych PI odkształcały się jednak inaczej: plazmolizie towarzyszyło zwiększenie a deplazmolizie zmniejszenie ich objętości. Poszukując przyczyny takich odkształceń dla każdej komórki o jądrze zabarwionym PI wyznaczono część obwodu sąsiadującą z komórkami o jądrach zabarwionych PI. Na tej podstawie stwierdzono, że odkształcenie komórek martwych towarzyszące plazmolizie (zwiększenie objętości) najprawdopodobniej wynika z biernego odkształcenia tych komórek pod wpływem odkształcenia żywych komórek sąsiednich (potwierdzono trzecią hipotezę roboczą).

Następnie badano, jakie odkształcenia powierzchniowe zewnętrznej ściany peryklinalnej towarzyszą traktowaniu osmotycznemu komórek adaksjalnej epidermy cebuli. Dla wielu komórek odkształcenia powierzchniowe były zgodne z oczekiwaniami (tj. plazmolizie towarzyszyło zmniejszenie powierzchni ściany, a deplazmolizie – zwiększenie), ale wielkość odkształceń była bardzo mała (bliska błędowi pomiarów). Analiza optycznych przekrojów poprzecznych przez te same komórki epidermy cebuli przed plazmolizą, po plazmolizie oraz po deplazmolizie, wykazała zaś, że mimo niewielkich

odkształceń powierzchniowych traktowaniu osmotycznemu towarzyszą zmiany krzywizny zewnętrznej ściany peryklinalnej przypominające zmiany powierzchni towarzyszące pompowaniu oraz spuszczeniu powietrza z materaca kieszeniowego.

W drugiej części badań analizowano układ prążków widocznych w mikroskopie Nomarskiego na wewnętrznej powierzchni ściany po zniesieniu naprężeń, aby na tej podstawie wnioskować o anizotropii odkształcenia zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek epidermy cebuli towarzyszącego plazmolizie. Wiadomo bowiem, że orientacja prążków jest prostopadła do kierunku maksymalnego odkształcenia. Analiza wykazała, że układ prążków jest zróżnicowany w obrębie ściany pojedynczej komórki, ale równocześnie zbliżony w części równowąskiej różnych komórek. Natomiast układ prążków na końcach komórek zależy od ich kształtu. Na tej podstawie stwierdzono, że odkształcenie powierzchniowe ściany towarzyszące plazmolizie jest anizotropowe, a maksymalne kurczenie w równowąskiej części komórek zachodzi w kierunku poprzecznym do osi komórki.

Następnie badano układ fibryl celulozowych w części równowąskiej komórek, na wewnętrznej powierzchni ściany, czyli powierzchni, na której pojawiają się prążki (mikroskop sił atomowych), oraz na całej grubości ściany osobno w części równowąskiej komórek oraz na końcach o różnych kształtach (mikroskopia polaryzacyjna). Miało to na celu sprawdzenie, czy anizotropia odkształcenia powierzchniowego ściany zależy od jej anizotropowych właściwości mechanicznych wynikających z układu fibryl celulozowych. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że anizotropia odkształcenia powierzchniowego ściany nie zależy od układu fibryl celulozowych w ścianie, ale od geometrii komórki (częściowo potwierdzono czwartą hipotezę roboczą).

VIII.2. Summary.

Adaxial epidermis of onion (*Allium cepa*) bulb scale was used to investigate relationships between cell deformations accompanying plasmolysis or deplasmolysis, mechanical properties of cell walls, and cell geometry. Onion epidermis is weakly attached to underlying parenchyma. Thus, tissue stresses do not occur in this tissue and it is easy to isolate without cells damage. Plasmolysis and deplasmolysis of onion epidermal cells leads to complete removal or restoration of tensile stresses in the cell walls, respectively, which are accompanied by cell wall deformation.

The following working hypotheses were tested:

Hypothesis 1: Plasmolysis and deplasmolysis of adaxial onion epidermal cells is accompanied by decrease or increase, respectively, of cell volume and surface area of outer periclinal cell wall.

Hypothesis 2: The extent of volume and area deformations accompanying plasmolysis and deplasmolysis depends on: maturity of onion from which the epidermal cells come from; amount of osmotic pressure modification; cell shape and size.

Hypothesis 3: Deformation of dead cells, accompanying the osmotic treatment, depends on the deformation of adjacent cells.

Hypothesis 4: Deformation anisotropy of outer periclinal cell walls, accompanying plasmolysis, depends on cell geometry, stress anisotropy in the wall of turgid state cell, and anisotropic mechanical properties of the wall.

First, epidermal cells, the walls of which were stained with Propidium Iodide (PI), were observed in confocal microscopy. PI staining additionally allowed to assess cell viability, because cells with nuclei stained by PI are often considered as dead. Next, using images from confocal microscopy and MorphoGraphX software, deformations accompanying osmotic treatment of epidermal cells were calculated. On this basis it was found, that most of volumetric deformations in cells with PI unstained nuclei were according to expectations: plasmolysis and deplasmolysis was accompanied by cell volume decrease and increase, respectively (the first working hypothesis was confirmed).

Next, factors affecting these deformations were searched for. Volumetric deformations accompanying plasmolysis and deplasmolysis were compared in cells coming from young and mature onions, which were incubated in hypotonic or isotonic PI solution before plasmolysis. The measurements showed that volumetric deformations are higher in cells coming from young onions, the walls of which are probably thinner and more elastic than cell walls in mature onion epidermis. Higher volume deformations were also found when osmotic pressure modification was higher: the change from hypotonic to hypertonic solution is higher than from isotonic to hypertonic solution. Moreover, the extent of volumetric deformations were related to cell shape and size (the second working hypothesis was confirmed).

Volumetric deformations accompanying plasmolysis and deplasmolysis of cells with PI stained nuclei were also studied. Contrary to the assumption about the cell death, it was found that the deformations of some of these cells were similar to deformations of cells with PI unstained nuclei (i.e. plasmolysis was accompanied by cell volume decrease,

deplasmolysis – by the increase). From studies on yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) it is known that transient membrane permeability may accompany osmotic treatments, and PI can reach living cell nucleus. Perhaps osmotic treatment causes similar membrane permeability in onion epidermal cells, therefore a part of cells with PI stained nuclei was in fact alive and thus deformed as expected. However, deformations of other cells with PI stained nuclei were different: plasmolysis was accompanied by cell volume increase and deplasmolysis – by decrease. In order to explain such deformations, for each cell with PI stained nuclei, a portion of its perimeter, which was adjacent to cells with PI stained nuclei, was assessed. On this basis it was found that the observed deformations accompanying plasmolysis of dead cells (volume increase) is likely a passive deformation resulting from deformation of alive adjacent cells (the third working hypothesis was confirmed).

Next, areal deformations of outer periclinal walls accompanying osmotic treatment were studied. For most of cells areal deformations were as expected (i.e. plasmolysis was accompanied by wall area decrease and deplasmolysis – increase), but the extent of these deformations was very low (likely close to the measurement error). Nevertheless, the analysis of optical transverse sections by the same cells before plasmolysis, after plasmolysis and after deplasmolysis, shows that despite the low areal deformations, osmotic treatment is accompanied by changes in outer periclinal wall curvature similar to those accompanying pumping and deflation of a mattress.

In the second part of studies we examined wrinkles, which are visible in Nomarski microscopy, which appear on the protoplast facing cell wall surface after the stress removal. The arrangement of wrinkles was analyzed in order to assess the anisotropy of the outer periclinal wall deformation accompanying plasmolysis. It is known that wrinkle orientation is perpendicular to the direction of maximal deformation. The analysis showed that wrinkle arrangement is not uniform within a single cell wall, but similar in central part of different cells. The wrinkle arrangement near the cell tip depends on the tip shape. These results show that deformation of outer periclinal walls, accompanying plasmolysis, is anisotropic and the direction of maximal shrinking in the central part of cells is transverse to the cell axis.

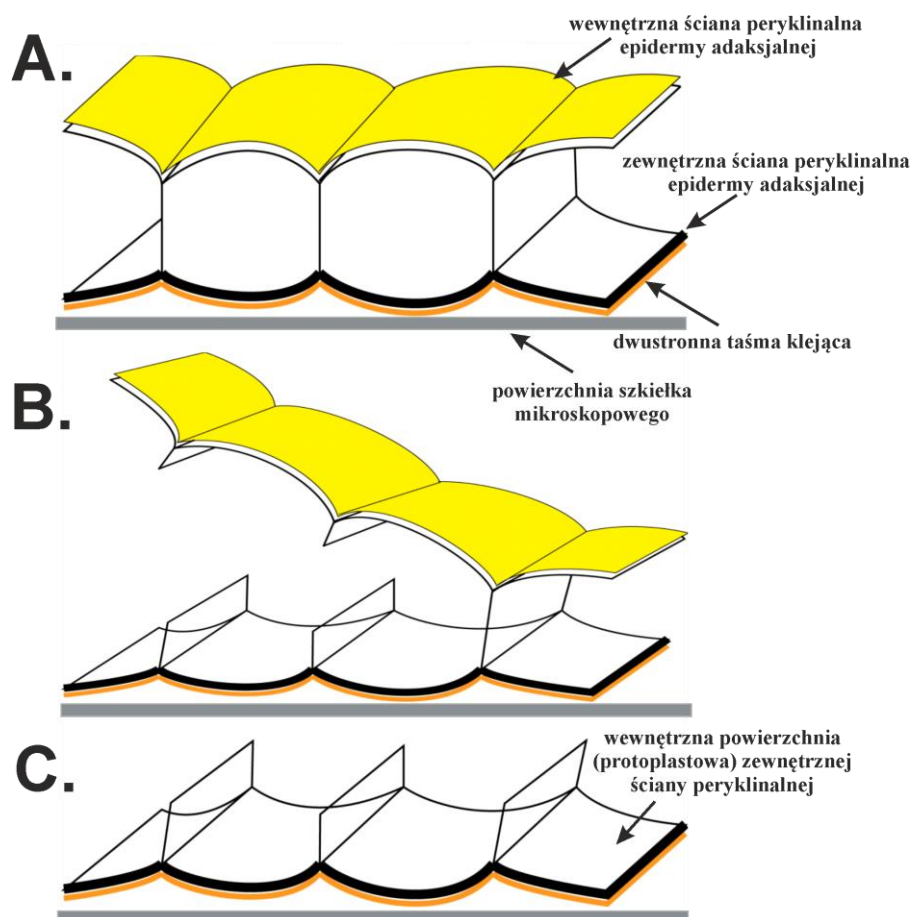
Next, cellulose fibrils arrangement was examined on the protoplast facing wall surface, i.e. the surface where wrinkles appear, for central parts of cells (Atomic Force Microscopy), and across the whole wall thickness in central parts of cells and variously shaped cell tips (polarized light microscopy). The aim of these studies was to check if the anisotropy of areal wall deformation depends on anisotropic mechanical properties of cell wall, which result from cellulose fibrils arrangement. The results showed that the deformation

anisotropy does not depend on the cellulose fibrils arrangement, but rather on geometry of the cell (the fourth working hypothesis was partly confirmed).

Aneks.

An.1. Metoda odsłaniania wewnętrznej powierzchni zewnętrznych ścian peryklinalnych komórek epidermy.

W celu odsłonięcia wewnętrznej powierzchni ściany, czyli powierzchni od strony protoplastu, najpierw izolowano fragmenty łusek o wymiarach około 2cm x 2cm. Następnie, po adaksjalnej stronie wyizolowanego fragmentu łuski, za pomocą ostrej żyłki nacinano delikatnie epidermę, dzieląc ją na 4-6 fragmentów. Tak przygotowany fragment łuski w zależności od przeprowadzanego eksperymentu: (i) od razu suszono od strony adaksjalnej delikatnym strumieniem zimnego powietrza przy użyciu suszarki do włosów, lub (ii) najpierw umieszczano w odpowiednio dobranym roztworze plazmolizującym, a następnie osuszano delikatnie ręcznikiem papierowym i suszono suszarką do włosów. Osuszone fragmenty epidermy izolowano z łuski za pomocą pincety i przyklejano do szkiełka mikroskopowego, wykorzystując dwustronną taśmę klejącą *Scotch*, w taki sposób, że fragment taśmy klejącej (Ryc.An.1.1.A zaznaczony na pomarańczowo) był z jednej strony przyklejony do szkiełka mikroskopowego, a z drugiej do zewnętrznej powierzchni wyizolowanego fragmentu epidermy. Na tym etapie preparat ponownie osuszano suszarką do włosów, po czym na powierzchnię wewnętrznych ścian peryklinalnych epidermy przyklejano drugi fragment dwustronnej taśmy klejącej (Ryc.An.1.1.A zaznaczony na żółto), który następnie powoli odrywano. Podczas odrywania taśmy ściany antyklinalne komórek epidermy ulegały rozerwaniu (Ryc.An.1.1.B), a na szkiełku mikroskopowym pozostawała odsłonięta wewnętrzna powierzchnia zewnętrznych ścian peryklinalnych (Ryc.An.1.1.C). Aby usunąć resztki protoplastu, próbki z odsłoniętą wewnętrzną powierzchnią ścian płukano w wodzie dejonizowanej lub poddawano chemicznemu traktowaniu w płuczce ultradźwiękowej (procedury traktowania chemicznego opisano w rozdziale Materiał i metody; III.2.1). Tak uzyskane próbki suszono ponownie suszarką do włosów i obserwowano w mikroskopie sił atomowych (AFM) lub mikroskopie polaryzacyjnym.



Ryc.An.1.1. Kolejne etapy odsłaniania wewnętrznej powierzchni zewnętrznych ścian peryklinalnych.

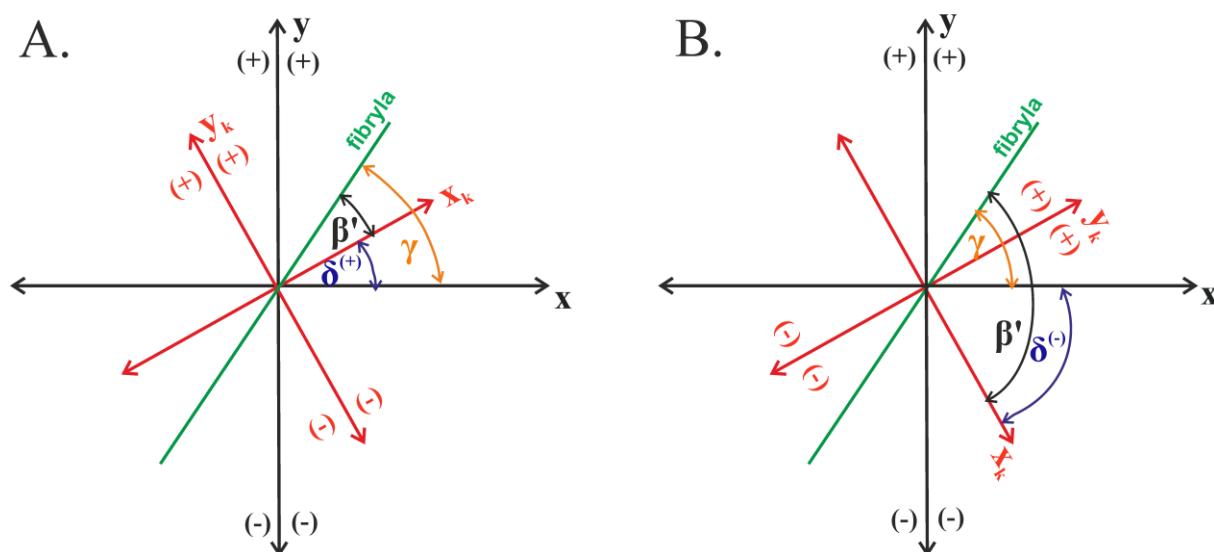
A - fragment epidermy przyczepiony do szkiełka podstawowego za pomocą dwustronnej taśmy klejącej (zaznaczona na pomarańczowo), przyklejonej do powierzchni zewnętrznych ścian peryklinalnych epidermy. Taśmę klejącą (zaznaczona na żółto) przyklejono także po drugiej stronie epidermy, czyli do powierzchni ścian peryklinalnych wewnętrznych.; **B** - rozrywanie komórek poprzez odrywanie taśmy przyklejonej do ścian peryklinalnych wewnętrznych (zaznaczone na żółto). Podczas usuwania taśmy dochodzi do rozrywania ścian antyklinalnych i odsłonięcia wewnętrznej powierzchni zewnętrznych ścian peryklinalnych.; **C** - zewnętrzne ściany peryklinalne z odsłoniętą powierzchnią wewnętrzną, przyklejone do szkiełka podstawowego.

An.2. Obliczanie kąta nachylenia fibryl celulozowych względem długiej osi komórki na podstawie pomiarów za pomocą narzędzia ImageJ FibrilTool.

Zmierzony za pomocą FibrilTool kąt jest kątem nachylenia fibryl względem osi x obrazu AFM. W związku z tym dla każdego obrazu konieczne było przeliczenie tego wyniku na kąt nachylenia względem osi komórki. W tym celu najpierw wyznaczano orientację długiej osi komórki (y_k) i kierunek do niej prostopadły (x_k) (Ryc.An.2.1), a następnie obliczano kąt ułożenia fibryl względem osi x_k , korzystając ze wzoru (1). Zgodnie z konwencją FibrilTool przyjęto, że kąt ułożenia fibryl względem osi x (obrazu) lub x_k (komórki) przyjmuje wartości dodatnie w układzie współrzędnych powyżej osi x (x_k) a ujemne poniżej (Ryc.An.2.1).

$$(1) \quad \beta' = \gamma - \delta$$

, gdzie β' – kąt nachylenia fibryl względem osi x_k , γ – kąt nachylenia fibryl względem osi x obliczony przez FibrilTool, δ – kąt pomiędzy osiami x i x_k



Ryc.An.2.1. Sposób obliczania kąta nachylenia fibryl celulozowych względem osi x_k (komórki) na podstawie wyników pomiarów FibrilTool. Czarne osie układu współrzędnych to osie obrazu AFM (te same osie zaznaczono na biało na Ryc.III.2.1.C), natomiast czerwone to osie komórki: długa (y_k) oraz prostopadła do niej oś krótka (x_k) (Ryc.III.2.1.C zaznaczone na żółto). Znaki (+) oraz (-) wskazują znak, jaki przyjmują wartości kąta w danej ćwiartce układu współrzędnych. Kąt δ to kąt pomiędzy osiami x i x_k , który w zależności od położenia względem siebie układów współrzędnych przyjmuje wartości dodatnie (A) lub ujemne (B); kąt γ to kąt nachylenia fibryl względem osi x obrazu obliczony przez FibrilTool; kąt β' to kąt nachylenia fibryl względem osi x_k , obliczony wg wzoru (1).

Kąt nachylenia fibryl względem osi x_k (β) przeliczano tak, by jego wartość mieściła się w przedziale od -90° do 90° :

$$\begin{aligned} (2) \quad & \text{dla } \beta' < -90^\circ: & \beta &= \beta' + 180^\circ \\ & \text{dla } \beta' > 90^\circ: & \beta &= \beta' - 180^\circ \\ & \text{dla } -90^\circ \leq \beta' \leq 90^\circ: & \beta &= \beta' \end{aligned}$$

, gdzie β' – obliczony według (1) kąt ułożenia fibryli celulozowych względem osi x_k , β – kąt ułożenia fibryli celulozowych względem osi x_k mieszczący się w przedziale od -90° do 90°

Następnie obliczano kąt α nachylenia fibryl względem długiej osi komórki (y_k), korzystając ze wzorów (3) lub (4), przyjmując, że na lewo od osi y_k w układzie współrzędnych ma on wartości ujemne (α^-) natomiast na prawo – wartości dodatnie (α^+), przy czym wartości te mieszczą się w przedziale od -90° do 90° (Ryc.III.2.2.).

$$(3) \quad \text{dla } \beta \leq 0: \alpha = -90^\circ - \beta$$

$$(4) \quad \text{dla } \beta > 0: \alpha = 90^\circ - \beta$$

An.3. Lista publikacji z udziałem Doktoranta.

- Lipowczan M., Borowska-Wykręt D., **Natonik-Białoń S.**, Kwiatkowska D. **2018.** *Growing cell walls show a gradient of elastic strain across their layers.* *Journal of Experimental Botany* 69: 4349–4362
- Kwiatkowska D., **Natonik-Białoń S.**, Burian A. **2019.** *Sequential Replicas: Method for In Vivo Imaging of Plant Organ Surfaces that Undergo Deformation.* In: Cvrčková F., Žárský V. (eds) *Plant Cell Morphogenesis. Methods in Molecular Biology*, vol 1992. Humana, New York, NY. pp.239-255
- **Natonik-Białoń S.**, Borowska-Wykręt D., Mosca G., Grelowski M., Wrzałik R., Smith R., Kwiatkowska D. **2020.** *Deformation of a cell monolayer due to osmotic treatment: a case study of onion scale epidermis.* *Botany* 98:21–36

An.4.

Natonik-Białoń S., Borowska-Wykręt D., Mosca G., Grelowski M., Wrzałik R., Smith R., Kwiatkowska D. **2020.** *Deformation of a cell monolayer due to osmotic treatment: a case study of onion scale epidermis.* Botany 98:21–36